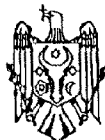




MD 4608 C1 2019.07.31

REPUBLICA MOLDOVA



(19) Agenția de Stat
pentru Proprietatea Intelectuală

(11) **4608** (13) **C1**
(51) Int.Cl: *A61K 39/008* (2006.01)
C07K 1/113 (2006.01)
C12N 15/62 (2006.01)
A23L 3/015 (2006.01)

(12) BREVET DE INVENȚIE

(21) Nr. depozit: a 2015 0031 (22) Data depozit: 2013.08.30 (31) Nr.: 61/694968; 61/830425 (32) Data: 2012.08.30; 2013.06.03 (33) Țara: US; US (41) Data publicării cererii: 2015.10.31, BOPI nr. 10/2015	(45) Data publicării hotărârii de acordare a brevetului: 2018.12.31, BOPI nr. 12/2018 (85) 2015.03.30 (86) PCT/US2013/057426, 2013.08.30 (87) WO 2014/036345 A2, 2014.03.06
(71) Solicitant: MERIAL INC., US; TOP INDUSTRIE S.A.S., FR (72) Inventatori: CARBOULEC Nicolas Pierre Yves, FR; MERIAN Gildas, FR; LABATUT Rene, FR; GERENTES Lionel, FR (73) Titular: MERIAL INC., US; TOP INDUSTRIE S.A.S., FR (74) Mandatar autorizat: GLAZUNOV Nicolae	

(54) Dispozitiv hiperbaric și metode de producere a vaccinurilor inactivate și
proteinelor recombinante repliate/solubilizate

(57) Rezumat:

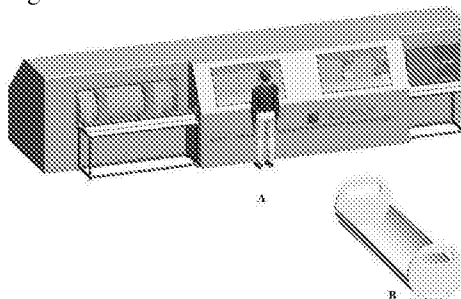
1

Invenția se referă la dispozitive hiperbarice pentru inactivarea microorganismelor și virusurilor, în același timp păstrând imunogenitatea lor și pentru obținerea și producerea proteinelor solubile, dezagregate, repliate sau active imunogenice sau terapeutice din incluziuni produse de procariote sau eucariote. Invenția include metode de inactivare hiperbarică a organismelor patogene și metode de producere a compozițiilor de vaccin utilizând agenți patogeni inactivați. Microorganismele inactivate hiperbaric sunt mai sigure și mai imunogenice decât microorganismele inactivate chimic. În mod similar, proteinele solubilizate au proprietăți superioare comparativ cu proteinele intens

2

agregate, inclusiv reacții imune nespecifice reduse.

Revendicări: 45
Figuri: 33



MD 4608 C1 2019.07.31

(54) Hyperbaric device and methods for producing inactivated vaccines and refolded/solubilized recombinant proteins

(57) Abstract:

1
The invention relates to hyperbaric devices for inactivating microorganisms and viruses while retaining their immunogenicity and for making and producing the soluble, disaggregated, refolded or active immunogenic or therapeutic proteins from inclusion bodies produced from prokaryotes or eukaryotes. The invention encompasses hyperbaric methods for inactivating pathogenic organisms and methods for producing vaccine compositions using the inactivated pathogens. The

2
hyperbarically inactivated microorganisms are safer and more immunogenic than chemically inactivated microorganisms. Similarly, the solubilized proteins have superior properties compared to more heavily aggregated proteins, including reduced non-specific immune reactions.

Claims: 45

Fig.: 33

(54) Гипербарическое устройство и методы производства инаktivированных вакцин и рекомбинантных белков повторно свернутых/солюбилизованных

(57) Реферат:

1
Изобретение относится к гипербарическим устройствам для инаktivации микроорганизмов и вирусов, при этом сохраняя их иммуногенность и для создания и производства растворимых, дезагрегированных, повторно свернутых или активных иммуногенных или терапевтических белков из включений, полученных из прокариот или эукариот. Изобретение включает методы гипербарической инаktivации патогенных организмов и методы получения вакцинных композиций с использованием инаktivированных патогенных микроорганизмов. Инаktivированные

2
гипербарической обработкой микроорганизмы являются более безопасными и более иммуногенными, чем химически инаktivированные микроорганизмы. Аналогичным образом, солюбилизованные белки обладают превосходящими свойствами по сравнению с более сильно агрегированными белками, включая сниженные неспецифические иммунные реакции.

П. формулы: 45

Фиг.: 33

Descriere:**(Descrierea se publică în redacția solicitantului)**

Această cerere revendică prioritatea cererilor provizorii US 61/694,968, depusă pe 30 august 2012, și 61/830,425, depusă pe 3 iunie 2013, ambele fiind încorporate în prezentul document prin referință în întregime. Toate documentele citate sau indicate prin referință în prezentul document, împreună cu instrucțiunile producătorului, descrierile, caracteristicile tehnice ale produsului, și listele de produse pentru orice produse menționate în prezentul document sau în orice document încorporate în prezentul document prin referință, sunt încorporate în prezentul document prin referință, și pot fi utilizate în practica invenției.

Prezenta invenție se referă la dispozitive hiperbarice și la metode de utilizare a acestuia pentru a inactiva microorganismele și/sau virusurile pentru utilizare în compoziții imunogene/vaccinuri, și pentru a replica și/sau solubiliza proteinele recombinante pentru utilizare în compoziții terapeutice și imunogene/vaccinuri.

Savanții din domeniul industriei alimentare de mult timp deja utilizează condițiile hiperbarice pentru a reduce sarcina microbiană a produselor alimentare. Biologii din domeniul producerii vaccinurilor sunt de asemenea foarte interesați de inactivarea microorganismelor, pentru utilizarea lor în prepararea vaccinurilor. Cu toate acestea, pentru a produce un vaccin sigur, eficient, este necesar de 1) a inactiva complet microorganismul patogen; și 2) a reține potențialul imunogen al organismului (imunogenitatea). Înaintea creării prezentei invenții, specialistul știa că anumite combinații de presiune, temperatură și timp ar putea fi utilizate pentru a reduce numărul de microorganisme viabile, cu toate acestea, el sau ea nu a avut o metodă general aplicabilă pentru a produce microorganisme inactivate „vaccin-potrivite”. Pentru exemple de reducere hiperbarică a poverii biologice în produsele alimentare, a se vedea de exemplu, Isbarn, 2007 (influenza); Ritz, 2000 (salmonella); și Wilkinson, 2001 (poliovirus). Până de curând, orice reținere a potențialului imunogen de către microorganisme a fost pur și simplu incidentală în raport cu obiectivul reducerii poverii microbiene [2, 3, 4].

În ceea ce privește utilizarea inactivării cu presiune înaltă pentru producerea vaccinurilor, un grup a realizat buna inactivare a *Leptospira interrogans* serotip *hardjo* prin supunerea microorganismelor la doi kilobari timp de șaiszeci de minute (Silva, 2001). *Leptospirele* inactivate au fost capabile să provoace răspunsuri imune la iepure, deși capacitatea lor de a provoca răspuns imun protector la un animal țintă, cum ar fi o bovină, nu a fost demonstrată. Până în prezent, solicitanții nu cunosc rezultate publicate care să demonstreze imunitatea protectoare completă, folosind bacterii presiune-inactivate sau paraziți protozoici. Pentru o revizuire, vă rugăm să consultați Shearer et al., 2009. Pe lângă faptul că nu oferă încă vaccinuri eficiente cu utilizarea metodelor de inactivare hiperbarică, domeniul a trebuit încă să producă dispozitive hiperbarice necesare. Dispozitivele de presiune hidrostatică ridicată (PHR- HHP) actuale dezvoltate doar pentru reducerea sarcinii microbiene sunt lipsite de capacitatea de a inactiva complet agenții patogeni și ai face utili în calitate de constituenți ai vaccinurilor [1, 5].

Mai mult decât atât, metodele hiperbarice existente introduc distribuții de temperatură eterogene, inacceptabile, ceea ce rezultă în randamente reduse pentru aplicațiile privind plierea/solubilizarea proteinelor și inactivarea agenților patogeni. Dispozitivele disponibile afectează creșterea presiunii prin utilizarea pompelor externe pentru a injecta lichidul suplimentar într-un vas de dimensiuni fixe. În esență, pompele din exteriorul vasului sporește presiunea apei, și cu cât mai multă apă este injectată în vas, presiunea crește, și un aranjament de supape menține presiunea dorită în interiorul camerei. Problema distribuției temperaturii provine de la pompă deoarece la sporirea presiunii din interiorul pompei, apa devine foarte fierbinte. La injectarea presiunii înalte, apa caldă produce gradul ridicat de eterogenitate a temperaturii. Aceste dispozitive pot fi astfel perfect adecvate pentru reducerea poverii patogene în produsele alimentare, unde reglarea cu precizie a temperaturii și presiunii nu este necesară, dar aceste dispozitive nu pot fi aplicate în mod eficient pentru a replica/solubiliza proteina sau a inactiva agenții patogeni, menținând totodată potențialul lor imunogen. Companiile care lucrează în acest domeniu includ Barofold (a se vedea, de exemplu, US6489450, US7064192, US7538198, US7767795, US7829681, US8329878 și US20080161242A1) și Avure, care produce dispozitive hiperbarice pentru industria de prelucrare a produselor alimentare [6].

Deoarece dispozitivele din stadiul tehnicii nu permit controlul optim al temperaturii și presiunii, dispozitivele hiperbarice proiectate pentru a efectua un control precis al acestor variabile sunt necesare pentru a facilita inactivarea agenților patogeni cu conservarea imunogenității și replierea/solubilizarea proteinelor.

Prin urmare, solicitanții au dezvoltat metode hiperbarice specifice și dispozitive pentru a produce microorganisme inactivate gata pentru vaccinuri și pentru a replica/solubiliza proteinele terapeutice și imunogene comerciale relevante.

Citarea sau identificarea oricărui document în această cerere nu este o acceptare a faptului că un astfel de document este disponibil ca stadiu al tehnicii pentru prezenta invenție.

Prezenta descriere se referă la un dispozitiv hiperbaric și metodele de utilizare a acestuia pentru 1) inactivarea microorganismelor păstrând în același timp imunogenitatea lor, și 2) replierea/solubilizarea proteinelor recombinante. Astfel, un prim obiectiv al prezentei descrieri este de a oferi un dispozitiv hiperbaric pentru inactivarea microorganismelor și replierea/solubilizarea proteinelor. Un alt obiectiv al prezentei descrieri este de a oferi metode pentru utilizarea dispozitivului hiperbaric pentru a inactiva microorganismele și a replia/solubiliza proteinele. Un al treilea obiectiv al descrierii este de a furniza compoziții imunogene care conțin microorganisme inactivate hiperbaric; și un al patrulea obiectiv al descrierii este de a oferi proteine imunogene și/sau terapeutice produse cu ajutorul dispozitivului hiperbaric.

Microorganismele inactivate hiperbaric ale prezentei invenții sunt ideal complet inactivate, păstrând în același timp potențialul lor imunogen, sunt sigure, și sunt capabile să provoace răspunsuri imune protectoare la animalele țintă, împotriva provocării virulente. În mod similar, proteinele imunogene și/sau terapeutice produse în mod hiperbaric sunt sigure și eficiente când sunt administrate la om și la animale.

Se observă că în această descriere și în special în revendicări, termenii cum ar fi „conține”, „a conținut”, „conținând” și altele asemenea pot avea semnificația atribuită lor în legislația SUA privind brevetele; de exemplu, ei pot însemna „include”, „a inclus”, „incluzând” și altele asemenea; și că termeni precum „constând esențial din” și „constă esențial din” au semnificația atribuită lor în legislația SUA privind brevetele, de exemplu, ei permit elemente recitate neexplicit, dar exclude elemente care se găsesc în stadiul tehnicii sau care afectează o caracteristică de bază sau nouă a invenției.

Acestea și alte exemple de realizare sunt dezvăluite sau sunt evidente din și cuprinse de descrierea detaliată care urmează.

Următoarea descriere detaliată, dată prin exemplu, și care nu intenționează să limiteze invenția la exemplele de realizare specifice descrise, poate fi înțeleasă împreună cu Figurile anexate, încorporate în prezentul document prin referință, în care:

FIG. 1A prezintă un dispozitiv hiperbaric conform invenției;

FIG. 1B prezintă un recipient-pungă pentru probe reprezentativ;

FIG. 2A prezintă un dispozitiv al presei hiperbarice (1) pentru comunicarea presiunii probelor. Fluidul intră în camera de fluid de înaltă presiune (3) prin intermediul orificiului de intrare (2) în timp ce plungerul/pistonul de refulare (5) este retras. Plungerul (5) apoi se extinde în poziția descrisă, iar garnitura de etanșare (6) și placa de obturare (7) previn scurgerea fluidului din camera de fluid de înaltă presiune (3). După terminarea ciclului (ciclurilor) de presurizare și depresurizare, lichidul este evacuat prin orificiul de evacuare (4). Presiunea este comunicată camerei de fluid primar (8) prin camera amplificatoare de presiune (9), care primește aer/fluid de înaltă presiune de la un dispozitiv amplificator de presiune. Presiunea în camera de fluid primar (8) se comunică camerei de fluid de înaltă presiune (3) prin plunger (5);

FIG. 2B este o redare tridimensională a unei prese (1) conform descrierii;

FIG. 3 este o versiune mărită a dispozitivului presei (1), axat pe camera de fluid primar (8). Diverse componente sunt etichetate și descrise suplimentar în secțiunea descrierii detaliate de mai jos;

FIG. 4 reprezintă o versiune mărită a dispozitivului presei (1), axat pe plunger (5). Diverse componente sunt etichetate și descrise suplimentar mai jos;

FIG. 5 reprezintă o versiune mărită a dispozitivului presei (1), axat pe placa de obturare (7). Diverse componente sunt etichetate și descrise mai jos;

FIG. 6 este o reprezentare schematică a unui dispozitiv hiperbaric, conform prezentei invenții, efectuând unui ciclu de presurizare/depresurizare pe o probă care conține agenți patogeni care urmează să fie inactivați sau peptide care urmează să fie repliate și/sau solubilizate din corpii incluziunilor bacteriene. 1) Produsul în cameră, gata de a fi încărcat; 2) extinderea cilindrului de încărcare; 3) evacuarea probei din camera de menținere; 4) retragerea cilindrului de încărcare; 5) poziționarea probei în cameră; 6) cilindrul avansează pentru a efectua etanșarea, care să permită multiplicarea umplerii cu presiune; 7) cilindrul stâng avansează pentru umplere; 8) cilindrul stâng avansează în continuare pentru a etanșa camera; 9) implementarea blocului, care împiedică retragerea cilindrului stâng; 10) cilindrul drept extins în continuare spre stânga pentru a crește presiunea; 11) presiunea eliberată; 12) blocul retras; 13) cilindrul stâng retras pentru drenare; 14) poziția inițială pentru multiplicatorul de presiune; 15) extinderea corpului pentru a descărca proba; 16) extinderea cilindrului de încărcare.

FIG. 7 reprezintă un bloc-schemă care prezintă funcționarea sigură a dispozitivului hiperbaric;

FIG. 8 reprezintă un bloc-schemă care prezintă acțiunile care trebuie întreprinse în cazul eşecului/rupturii pungii cu microorganism în interiorul camerei de înaltă presiune;

FIG. 9 este o reprezentare schematică a antigenilor protectoare presupuse *Leptospira*;

FIG. 10 prezintă rezultatele analizei Western Blot pentru suspensiile *Leptospira* supuse anterior fie la inactivarea chimică, hiperbarică sau neinactivare. Tulpinile: *L. canicola*, *L. ictero*. Antigenii: LipL32, LipL41 și LipL46;

FIG. 11 prezintă rezultatele analizei Western Blot pentru suspensiile *Leptospira* supuse anterior fie la inactivarea chimică, hiperbarică sau neinactivare. Tulpinile: *L. canicola*, *L. ictero*. Antigenii: LigA și LigB;

FIG. 12 prezintă rezultatele analizei Western Blot pentru suspensiile *Leptospira* supuse anterior fie la inactivarea chimică, hiperbarică sau neinactivare. Tulpina: *L. grippotyphosa*. Antigenii: LipL32, LipL41 și LipL46;

FIG. 13 prezintă rezultatele analizei Western Blot pentru *L. grippotyphosa* supuse anterior fie la inactivarea chimică, hiperbarică sau neinactivare. Antigenii: LigA și LigB;

FIG. 14A și 14B descriu cuantificarea datelor analizei Western Blot. Ca și înainte, *L. grippotyphosa* (A) și *L. icterohaemorrhagiae* (B) au fost supuse în prealabil fie la inactivarea chimică, hiperbarică sau neinactivare. Antigen: lipopolizaharide (LPZ). Petele au fost cuantificate utilizând Pixel (tehnica LICOR);

FIG. 15 reprezintă un grafic care prezintă inactivarea hiperbarică a bacteriilor utilizând diferite combinații de temperatură și presiune. Deși inițial efectiv inactivate, bacteriile au restabilit viabilitatea pentru fiecare set de condiții;

FIG. 16 prezintă condițiile experimentale de temperatură și presiune care rezultă în bacteriile hiperbaric inactivate care nu au reușit să restabilească viabilitatea;

FIG. 17 FACS-ul (sorter celular cu excitarea fluorescenței) celulelor inactivate cu formolină (două populații discrete de bacterii), mertiolat (eterogenitate ușoară) sau condiții hiperbarice (omogenitate completă);

FIG. 18 prezintă marcarea fluorescentă p65 a formolinului, mertiolatului și *Erysipelothrix rhusiopathiae* tratate hiperbaric. Aproape 100% din celulele inactivate hiperbaric sunt marcate;

FIG. 19 Western Blot-urile arată recunoașterea umorală a serurilor de la șoareci vaccinați cu ingrediente active (IA) inactivate cu formolină, hiperbaric sau cu mertiolat. Astfel cum este indicat, IA inactivat cu formol nu provoacă răspunsul Mab-specific, întrucât atât IA inactivat hiperbaric, cât și IA inactivat cu mertiolat provoacă răspunsul specific;

FIG. 20 indică supraviețuirea la sută și serologia pentru șoarecii vaccinați cu diluții ale *E. rhusiopathiae* inactivat cu formolină, mertiolat sau condiții hiperbarice;

FIG. 21 recunoașterea umorală prin seruri de la porci vaccinați cu IA *Erysipelothrix rhusiopathiae* inactivat cu formolină, hiperbaric sau mertiolat. După cum s-a arătat, benzi difuze de 60 și 75KDa sunt prezente, similare cu studiul pe șoareci;

FIG. 22 recunoașterea umorală prin seruri de la porci vaccinați cu o proteină SpaA recombinantă. După cum s-a arătat, există mai multe benzi în jurul 65-75KDa pentru vaccinați (+), dar nici o bandă pentru martorii negativi (-). Rezultatele indica că atât vaccinarea cu SpaA inactivată hiperbaric, cât și inactivată cu mertiolat (dar nu inactivată cu formolină) a determinat porcii să producă anticorpi specifici pentru P65;

FIG. 23 reprezintă un grafic care prezintă titrele de anticorpi anti-*E. rhusiopathiae* după vaccinare cu diferite vaccinuri;

FIG. 24 reprezintă imaginile microscopiei electronice de scanare a căldurii și concentratului de *Bordetella pertussis* inactivat hiperbaric supus la 4000 bari timp de 90 de minute (partea dreaptă) și a concentratului de *Bordetella pertussis* inactivat cu mertiolat (partea stângă) (mărire X30000)

FIG 25 descrie SDS-PAGE a probelor KSAC (peptide de fuziune din specia *Leishmania*) tratate cu 3000 de bari;

FIG. 26 reprezintă o cromatogramă CLPÎ a supernatantului KSAC tratat cu 3000 de bari și suprapus peste proteina KSAC obținută utilizând un procedeu de repliere/solubilizare clasic;

FIG. 27 prezintă distribuția dimensiunii DLS prin intensitatea (de sus) și numărul (de jos). Afișate sunt datele pentru proteina presurizată cu 3000 bari (linia mai deschisă) și proteina repliată clasic (linia mai închisă);

FIG. 28 prezintă efectul presiunii și tamponului asupra dimensiunii proteinei;

FIG. 29 prezintă o comparație a conținutului de proteină solubilă KSAC determinat prin CLPÎ & Qdot-blot;

FIG. 30A-30D reprezintă analiza Q-Dot Blott a probelor KSAC după tratamentele cu presiune înaltă;

FIG. 31 reprezintă analiza CLPÎ a probelor KSAC după tratamentul prin procedeul A;

FIG. 32 reprezintă analiza CLPÎ a probelor KSAC după tratamentul prin procedeul B.

FIG. 33 prezintă analiza CLPÎ a probelor KSAC după tratamentele prin procedeele A, B și clasic.

Prezenta invenție se referă la un dispozitiv hiperbaric pentru 1) inactivarea microorganismelor păstrând totodată imunogenitatea lor, și 2) replierea/solubilizarea proteinelor recombinante. Astfel, un prim obiectiv al prezentei descrieri este de a oferi un dispozitiv hiperbaric pentru inactivarea „microorganismelor” (care, astfel cum sunt utilizate aici, sunt definite ca bacterii, protozoare, orice alte eucariote unicelulare, orice alte monerane, precum și virusuri), păstrând în același timp imunogenitatea lor. Dispozitivele, conform invenției, pot avea un mijloc pentru controlul de precizie al temperaturii și un mijloc pentru controlul de precizie al presiunii.

Intr-o variantă de realizare, dispozitivul are un mijloc de recepționare a pungilor sau altor recipiente adecvate, care sunt umplute cu microorganisme care urmează a fi inactivate. Dispozitivul poate avea încorporat în acesta o varietate de mijloace pentru prelevarea probelor și evaluarea stării de inactivare a microorganismelor. Toate funcțiile dispozitivului pot fi controlate printr-o interfață și un procesor de utilizator adecvate. Pe lângă inactivarea microorganismelor, dispozitivul hiperbaric poate fi utilizat în mod eficient în replierea/solubilizarea proteinelor recombinante pliate și/sau prinse în incluziunile virale în mod necorespunzător. Dispozitivul prezentat oferă un avantaj semnificativ față de tehnologiile anterioare, în parte, deoarece permite efectuarea simultană a replierii și solubilizării proteinelor.

Invenția se referă în continuare la modele computerizate și la metode de modelare a distribuției temperaturii în interiorul unor dispozitive de înaltă presiune. Menținerea unei distribuții uniforme sau omogene a temperaturii este esențială pentru aplicațiile necesare, cum ar fi inactivarea agenților patogeni cu păstrarea imunogenității și replierea/solubilizarea proteinelor. Măsurători de temperatură precise au fost luate în timpul funcționării dispozitivelor de înaltă presiune existente, iar aceste puncte de date au fost utilizate pentru a dezvolta un model de distribuție a temperaturii, care a fost validat pentru măsurători reale luate de la mașinile existente care operează în diferite condiții de temperatură și presiune. Pe scurt, modelul a prezis cu exactitate distribuția temperaturii în interiorul vaselor existente, și astfel modelul a fost aplicat pentru a proiecta un dispozitiv de înaltă presiune capabil să minimizeze eterogenitatea distribuției temperaturii. Astfel, într-o variantă de realizare, dispozitivele descrise sunt lipsite de variația de temperatură inacceptabilă.

Modelul de distribuție a temperaturii a ghidat selecția parametrilor dimensionali, inclusiv lungimea tubului, grosimea și altele asemenea, cu scopul de a minimiza variația temperaturii în interiorul camerei de presiune înaltă. Spre deosebire de camerele hiperbarice de dimensiuni fixe din stadiul tehnicii, prezenta invenție prevede un dispozitiv hiperbaric cu presă cu piston, în care dimensiunea camerei de înaltă presiune nu este constantă, datorită extinderii și retragerii presei cu plunger sau piston. Dimensiunea camerei scade astfel cu ridicarea presiunii și crește cu scăderea presiunii.

Intr-o variantă de realizare, dispozitivele conform prezentei invenții conține un piston și o garnitură de etanșare care comunică presiunea la fluid, inclusiv apă, într-o cameră de presiune ridicată. Presiunea crescută depășește forțele de respingere intermoleculare (de exemplu H_2O la H_2O), iar la 6000 bari, volumul de apă este redus cu aproximativ zece procente, în raport cu condițiile de presiune ambiante. Dispozitivul invenției este deosebit de util pentru inactivarea agenților patogeni, deoarece temperatura și presiunea foarte controlabile pot fi utilizate pentru a stabiliza proteinele în starea lor nativă (adică bune pentru păstrarea imunogenității), în timp ce distrugerea/blocarea activității enzimatică suficient de îndelungată pentru a face agenții patogeni neinfecțioși. Într-o variantă de realizare particular, microorganismele sau agenții patogeni niciodată nu se restabilesc de la daunele moleculare hiperbaric-mediate inițiale.

De asemenea, reglarea precisă a presiunii și temperaturii poate fi utilizată pentru a facilita replierea/solubilizarea proteinelor. O proteină are un volum molecular specific, care este determinat de structura sa tridimensională, care este o funcție a conținutului de aminoacizi inerent, structurile sale secundare și interacțiunea multor forțe, inclusiv interacțiuni van der Waals și electrostatice, interacțiuni hidrofobe, legături de hidrogen, legături disulfurice, temperatură, presiune, și altele asemenea. Când o proteină este anormal pliată, volumul său specific este de obicei mai mare decât atunci când aceeași proteină este pliată corect. Într-o variantă de realizare, presiunea este aplicată cu precizie pentru a facilita plierea proteinei, care rezultă într-o reducere a volumului specific al proteinei.

Astfel cum este utilizat aici, „pliată corespunzător” înseamnă că proteina este în configurația sa nativă, care este configurația cea asociată cu sau atribuită proteinei atunci când este competentă să joace rolul său structural și sau funcțional primar. De exemplu, un receptor al membranei celulare este în configurația sa nativă atunci când este capabil să interacționeze cu ligandul (liganzii) său(săi) înrudit(ți) pentru a se angaja în activități de semnalizare celulară. În mod similar, o enzimă este în configurația sa nativă atunci când este capabilă să interacționeze cu și să catalizeze reacțiile relevante cu substrat(urile) său(sale) cunoscut(e).

Intr-o variantă de realizare, replierea/solubilizarea proteinelor controlată este realizată mai întâi prin aplicarea unei presiuni să restricționeze libertatea de deplasare a proteinei anormal pliate (de exemplu vibrația și rotația moleculară). Cu toate acestea, scăderea presiunii prea repede poate restricționa deplasarea atât de mult încât proteina să nu-și poată asuma configurația sa nativă (pliată în mod corespunzător). Prin urmare, dispozitivele conform invenției trebuie să fie capabile să controleze cu atenție presiunea și viteza la care presiunea este schimbată (și, astfel, aplicată la probe biologice), pentru a permite 1) o determinare inițială a condițiilor de repliere/solubilizare optimă/ ideale; și 2) aplicarea condițiilor menționate la probe echivalente în viitor.

Intr-o altă variantă de realizare, temperatura poate fi mărită pentru a crește mișcarea și energia (de exemplu, mișcarea Browniană, vibrația intramoleculară sau mișcarea interatomică), pentru a reduce timpul necesar pentru ca proteina anormal pliată să-și asume configurația sa nativă.

În variante de realizare preferate, combinații precise de condiții de temperatură și presiune sunt determinate pentru fiecare tip de probă biologică pentru a minimiza cantitatea de timp necesară pentru a produce procentul maxim de proteine pliate în mod corespunzător.

Intr-o altă variantă de realizare, dispozitivul este avantajos față de dispozitivele hiperbarice anterioare prin aceea că prevede scăderile controlate ale presiunii, precum și menținerea la presiuni constante. Proteinele supuse la aceste condiții de presiune controlată sunt mai susceptibile să se replieze eficient la configurațiile lor native, în comparație cu proteinele supuse la scăderea rapidă și necontrolată a presiunii (adică reducerea necontrolată a presiunii atribuie energie excesivă proteinelor, permițându-le să se deplaseze sau să sară la configurații nenative încă, energetic stabile).

În câteva variante de realizare, dispozitivul hiperbaric dezvoltat conține un bloc de piston și cilindru, care reduce sau elimină cantitatea de repliere/solubilizare necorespunzătoare nedorită permițând reglarea și controlul cu precizie a scăderilor de presiune.

Intr-o variantă de realizare, dispozitivul este avantajos prin aceea că poate fi decontaminat convenabil și rapid. Intr-o variantă de realizare particulară, dispozitivul este complet conform cu GMP, poate fi deschis din ambele părți, și poate fi curățat prin orice metodă rezonabilă, inclusiv, dar fără a se limita la curățarea cu abur.

Prezenta invenție prevede astfel un dispozitiv hiperbaric cu presă cu piston, care permite controlul și reglarea cu precizie a presiunii și temperaturii pentru a determina (și apoi a asigura) echilibrul optim al presiunii și temperaturii pentru a efectua replierea/solubilizarea maximă a proteinelor și, prin urmare, a obține randamentul.

Aceleași proprietăți permite dispozitivului, de asemenea, să optimizeze și să aplice combinații eficiente de presiune și temperatură pentru a inactiva microorganisme/agenți patogeni păstrând în același timp potențialul lor imunogen. În unele variante de realizare, dispozitivul hiperbaric îmbunătățește potențialul imunogen al microorganismelor pe care le inactivează.

Intr-o variantă de realizare, invenția prevede o manta de protecție a dispozitivului hiperbaric (vezi FIG. 1A). Mantaua este destinată pentru a lua în considerare atât constrângerile de presiune înaltă, cât și ușurința de curățare/decontaminare. Mantaua poate găzdui orice volum și condiții de presiune utile comercial, incluzând, dar nu numai, până la 4000 de bari, până la 5000 de bari, până la 6000 de bari, până la 7000 de bari, până la 8000 de bari, până la 9000 de bari sau până la aproximativ 10,000 de bari. Volumele de operare utile includ, de exemplu, 50 de litri sau mai mult.

Intr-o variantă de realizare, dispozitivul de inactivare amplasat în interiorul mantalei poate conține doi cilindri încorporați într-un cadru metalic. Dispozitivul poate asuma orice configurație utilă, în conformitate cu această descriere, și poate avea forma generală descrisă în FIG. 2A, 2B, 3 și 4.

Intr-o variantă de realizare, precum cea descrisă în FIG. 2A, dispozitivul hiperbaric conține un ansamblu de presă (1) pentru comunicarea presiunii la probă. Fluidul intră în camera de fluid de înaltă presiune (3) prin gura de intrare (4), în timp ce plungerul amplificator de presiune (5) este retras. Plungerul (5) se extinde apoi în poziția descrisă, iar garniturile de etanșare (6) de înaltă presiune a plungerului și placa de obturare de înaltă presiune (7) previn scurgerea fluidului din camera de fluid de înaltă presiune (3). După finalizarea ciclului (ciclurilor) de presurizare și depresurizare, fluidul este evacuat prin gura de evacuare (2). Presiunea se comunică la camera de fluid primar (8) prin camera superioară a amplificatorului (9). Presiunea în camera de fluid primar (8) se comunică la camera de fluid de înaltă presiune (3) prin plunger (5).

Intr-o variantă de realizare, ansamblul preseii poate include componente astfel cum este ilustrat în vederile mărite din FIG. 3-5. Ansamblul poate include: o placă de fixare a garniturii de etanșare (20); șuruburi de fixare a plungerului principale (22a & b); un dispozitiv de demontare a suportului camerei superioare (24a & b); un dispozitiv de demontare a camerei superioare (25a); o garnitură de etanșare a camerei superioare (25b); o gură de intrare a fluidului primar (26); un suport al camerei inferioare (27a); un dispozitiv de demontare a suportului camerei inferioare; și un dispozitiv de demontare a camerei inferioare (29a).

Intr-o variantă de realizare, cadrul metalic poate fi încărcat pentru a absorbi sarcina axială a camerei cu piston și multiplicatorului, astfel încât aceste două elemente să rămână fixe în ciuda forțelor generate de presiune.

Intr-o variantă de realizare particulară, un design compact minimizează răspândirea contaminării, în cazul unei fisuri, în special în comparație cu un design mai deschis care necesită un grup de surse de presiune independente și externe. În plus, designul compact evită necesitatea pentru o serie de conducte de

înalță presiune, ceea ce ar necesita înlocuirea frecventă a numeroaselor supape, ceea ce nu este de dorit într-o zonă contaminabilă.

Intr-o variantă de realizare, amplificatorul de presiune și pistonul pot fi separați de mantaua de protecție pentru a permite accesul ușor la interiorul mantalei de protecție și schimbarea ușoară a garniturilor pistonului în caz de contaminare. Multiplicatorul de presiune poate prevedea, de preferință, perioade de timp mai lungi, de exemplu, până la aproximativ 10 ore, 11 ore, 12 ore, 13 ore, 14 ore, 15 ore, 16 ore, 17 ore, 18 ore, 19 ore sau aproximativ 20 de ore, sau mai mult.

Intr-o variantă de realizare, întregul ansamblu este de aproximativ 7,4 metri, înălțimea este de aproximativ 1,6 metri și lățimea este de aproximativ 2,2 metri. Într-o variantă de realizare, ansamblul cântărește aproximativ 12,700 kg. Orice alte dimensiuni rezonabile și rezonabile comercial ale ansamblului sunt contemplate de această descriere, astfel un specialist poate modifica aceste dimensiuni, fără a exercita muncă altă decât cea de rutină.

Intr-o variantă de realizare, mantaua este complet acoperită pentru a limita depunerea prafului. Ansamblul poate fi sterilizat de exemplu, prin injectarea unui aerosol de peroxid de hidrogen în manta. Capacele pot fi demontate pentru a asigura o curățare intensă, iar piesele de lucru vor permite accesul în interiorul dispozitivului, în special, pentru a permite schimbarea garniturilor de etanșare.

Intr-o variantă de realizare, mantaua este executată dintr-un material decontaminabil, în special din oțel inoxidabil. Cu un exemplu de înaltă presiune de 4000 de bari, oțelul posedă în mod ideal rezistență mecanică/integritate înaltă. Într-o variantă de realizare, materialul poate fi INCONEL 718.

Intr-o variantă de realizare, diametrul interior al camerei poate fi de 150 mm, iar diametrul exterior poate fi de 440 mm. În această variantă de realizare, un volum interior de 50 de litri produce astfel o lungime internă liberă de aproximativ 2,8 metri. La aproximativ 4000 de bari, compresibilitatea apei este de aproximativ 13%. Bulele de aer din probe se pot adăuga la calculele generale de compresibilitate. Într-o variantă de realizare, lungimea liberă la presiune atmosferică a fost calculată cu compresie de 20%, sau aproximativ 3,4 metri. Aceasta oferă o lungime totală a camerei de aproximativ 3,9 metri, și o masă de aproximativ 4900 kg.

Intr-o variantă de realizare, ansamblul poate împiedica eliberarea apei potențial contaminate, prin evacuarea conținutului de apă din cameră, apoi reetanșarea pieselor de capăt. Gurile de intrare și gurile de evacuare sunt prevăzute cu găuri perpendicular cu axa mantalei. Într-o variantă de realizare particulară, mantaua este o singură piesă.

Intr-o altă variantă de realizare, câte un mijloc de etanșare pentru piston/cilindru este prevăzut pe o parte de garnitura pistonului de presiune (6), pe altă parte de o placă de obturare (7). Ambele mijloace de etanșare pot fi din oțel inoxidabil având o rezistență mecanică mare. Mijloacele de etanșare pot fi, de asemenea, acoperite cu, sau constau din, orice material adecvat.

Intr-o variantă de realizare, dispozitivul se deplasează lateral, pentru a permite încărcarea și descărcarea pungilor pentru probe care conțin microorganisme, proteina care urmează a fi repliată, și altele asemenea. Pungile pentru probe pot fi transportate în containere care sunt conduși secvențial în dispozitiv, cum ar fi un tren mic. Camera poate fi poziționată pe roți care circulă pe șine, cu întregul proces fiind condus de un piston.

Intr-o variantă de realizare, aparatul conține un amplificator de presiune, care poate fi executat din oțel inoxidabil. Cu toate acestea, din moment ce amplificator de presiune nu este supus la aceleași rigori ca ansamblul de piston/cilindru, amplificatorul poate fi executat din oțel proiectat 1,4418. Într-o variantă de realizare, amplificatorul are forma unui cilindru cu diametrul exterior de 620 mm și lungimea de 1750 mm, greutatea de 2200 kg. În interior este amplasat pistonul. Diametrul interior al părții primare este de 540 mm. Acesta conține până la 160 de litri de ulei. Acest volum este debitat de un dispozitiv hidraulic de 310 bari cu un debit de 250 litri/oră și instalat în afara încăperii. Presiunea în circuitul primar este de 310 bari.

Cursa pistonului poate fi de aproximativ 940 mm. În poziția retrasă, acesta poate fi eliberat în întregime din manta. Cu toate acestea, etanșarea garniturii în manta este accesibilă pentru a permite schimbarea sau curățarea ușoară, ca și garnitura clapetei, când mantaua este alimentată în partea de încărcare/descărcare.

Partea centrală a plungerului cu piston (5) poate fi goală și poate conține magneți pentru a permite deplasarea și măsurarea continuă și precisă a locației pistonului. În caz de scurgere a garniturii de etanșare, presiunea poate fi menținută prin avansarea corespunzătoare a pistonului pentru a compensa scurgerea și a asigura inactivarea. Garnitura de etanșare poate fi înlocuită la următoarea deschidere a camerei.

Intr-o variantă de realizare, un dispozitiv de acționare permite deplasarea laterală a multiplicatorului pentru a facilita curățarea.

Intr-o altă variantă de realizare, un sistem de verificare cu laser poate fi prevăzut pentru a asigura ajustarea corectă a camerei și cilindrilor de multiplicare.

Intr-o altă variantă de realizare, cadrul metalic este proiectat pentru a menține camera și multiplicatorul în loc atunci când acesta din urmă exercită o presiune de 4000 de bari în interiorul mantalei. Cadrul poate

consta din mai multe plăci de oțel structurale perforate. Prelucrarea cu sudură poate fi utilizată pentru a preveni penetrarea formei lichide sau de ceață între plăci. Ansamblul poate fi acoperit cu o vopsea protectoare sau alt înveliș de protecție corespunzător.

5 Intr-o variantă de realizare, partea exterioară a lungimii cadrului este de aproximativ 6,8 metri, înălțimea acestuia este de aproximativ 1,3 metri, iar greutatea lui este de aproximativ 5600 kg.

Intr-o altă variantă de realizare, o țeavă comunică energie hidrolică de la un dispozitiv hidrolic. Țeava poate fi fixată și poate fi înlăturată atunci, când multiplicatorul este deplasat pentru întreținere.

10 Intr-o variantă de realizare, mantaua este alimentată cu apă demineralizată printr-o țeavă sau conductă adecvată. Conducta poate fi flexibilă și/sau extensibilă astfel că nu trebuie să fie eliminată în timpul deplasării mantalei la poziția de încărcare/descărcare. O a doua țeavă sau conductă pot fi prezentă, pentru a permite injectarea aerului comprimat pentru uscarea camerei înainte de deschidere. O parte a conductei de evacuare din apropierea mantalei poate fi, de asemenea, flexibilă pentru a adapta limitele de deplasare ale mantalei.

15 Evacuarea mantalei este la sistemul de tratare a apei al clădirii. Chiar și la deteriorarea pungii, chiar dacă barul de sprijin de 4000 a fost respectat, apa poate fi evacuată fără prelucrare suplimentară.

Cu toate acestea, în caz de eșec de a atinge reducerea timpului de menținere, apa va fi evacuată într-un rezervor independent, permițând efectuarea unei analize pentru a determina dacă contaminarea a fost o posibilă deteriorare a pungii, precum și a prelucrării specifice. Aceasta va fi aceeași pentru apa utilizată pentru clătirea mantalei.

20 Intr-o variantă de realizare a primului obiectiv, dispozitivul hiperbaric poate fi amplasat în interiorul unui corp având un aspect general, astfel cum este schematizat în FIG. 1A. Dispozitivul hiperbaric poate fi conceput pentru a adapta și a primi dispozitive de fixare a probei, astfel cum este ilustrat în FIG. 1B. Una din caracteristicile importante ale dispozitivului este aceea că microorganismele care urmează să fie probe pentru a fi supuse la presiune ridicată sunt conținute în pungi elastice, în loc să fie „expuse direct” (de
25 exemplu, ca o suspensie de microorganisme concentrate) la schimbările de temperatură și presiuni hidrostatice. În schimb, o suspensie de microorganisme concentrate poate fi sigilată ermetic în pungi pentru probe, care sunt destinate pentru a fi încadrate într-un suport pentru pungă sau recipient, ca cel ilustrat în FIG. 1B. Această abordare la inactivarea hiperbarică a microorganismelor transmite multiple avantaje, inclusiv consecvența prelucrării probei, ușurința de decontaminare a dispozitivelor (în caz de ruptură a
30 pungii) și șansă redusă de contaminare (de exemplu, chiar dacă o pungă devine contaminată, balanța lotului poate rămâne curată).

Intr-o altă variantă de realizare a primului obiectiv, dispozitivul conține un dispozitiv de presă cu piston precum cel descris în FIG. 2A. Dispozitivul hiperbaric (1) comunică cantități controlate de presiune la probe. Presiunea este inițial comunicată la o cameră de fluid primar (8) printr-o cameră intensificatoare de
35 presiune (9), care primește aer/lichid de înaltă presiune dintr-un dispozitiv intensificator de presiune. Presiunea în camera de fluid primar (8) se comunică la camera de fluid de înaltă presiune (3) prin plunger (5). Înainte de extinderea plungerului (5), fluidul intră într-o cameră de fluid de înaltă presiune (3) prin intermediul gurii de intrare (2) în timp ce plungerul de presiune (5) este retras. Plungerul (5) se extinde apoi în poziția ilustrată în FIG. 2A, iar garnitura de etanșare (6) și placa de obturare (7) previn scurgerea
40 fluidului din camera de fluid de înaltă presiune (3). După terminarea ciclului de presurizare și depresurizare (s), fluidul este evacuat prin gura de evacuare (4). Intr-o variantă de realizare, dispozitivul hiperbaric conține componente astfel cum este indicat în FIG. 3, 4, 5 și 6.

45 Intr-o variantă de realizare particulară, probele pot fi prelucrate de către dispozitivul hiperbaric conform schemei prezentate în FIG. 7. Descrierea prevede astfel o metodă de repliere/solubilizare sau dezagregare a proteinelor, sau de inactivare a agenților patogeni păstrând în același timp imunogenitatea lor, care include etapele de:

- 1) plasare a unei probe într-o cameră de încărcare;
- 2) extindere a unui cilindru de încărcare;
- 3) îndepărtare a probei din camera de încărcare;
- 50 4) retragere a cilindrului de încărcare;
- 5) poziționare a probei în camera de înaltă presiune;
- 6) extindere a avansurilor unui cilindru drept pentru a executa o garnitură de etanșare, care să permită umplerea unui multiplicator de presiune cu un fluid;
- 7) extindere a unui cilindru stâng;
- 55 8) extindere în continuare a cilindrului stâng pentru a sigila camera de presiune ridicată;
- 9) poziționare a unui bloc care împiedică retragerea cilindrului stâng sub forța presiunii;
- 10) extindere a cilindrului drept mai spre stânga pentru a crește presiunea;
- 11) eliberare a presiunii;
- 12) retragere a blocului;

- 13) retragere a cilindrului stang pentru a permite drenarea fluidului;
- 14) revenire a multiplicatorului de presiune la poziția sa inițială;
- 15) extindere a corpului pentru a descărca proba;
- 16) extindere a cilindrului de încărcare.

Intr-o variantă de realizare, dispozitivul conține astfel un mijloc de recepție a suporturilor de pungă și livrarea sau poziționarea lor pentru a fi expuse la presiunea hidrostatică ridicată (PHR - HHP), produsă prin acțiunea ansamblului de presă/piston izostatic. Dispozitivul conține mijloace de expunere a pungilor la temperaturi și presiuni specifice pentru anumite perioade de timp specifice. Dispozitivul poate avea o rețea locală de alimentare cu apă circulantă pentru a controla cu precizie temperatura mantalei dispozitivului. Temperatura mantalei și rețeaua de alimentare cu apă circulantă poate varia astfel cum este indicat în Tabelul 1. Dispozitivul poate aplica un interval larg de presiune, până la, de exemplu 7000 de bari, 8000 de bari, 9000 de bari sau 10,000 de bari. Dispozitivul poate include orice număr de componente pentru a realiza presiunile și temperaturile necesare.

Tabelul 1. Extremele și temperaturile medii din mantaua de 50L, ca răspuns la schimbările temperaturii inițiale a mantalei și temperatura apei pentru producție. Pmax = 3500 de bari; V = 1000 bari/min, Ceai 1 oră, 1 ciclu: Pmax = 3500 de bari, V = 1000 bari/min, platou 1 oră, 1 ciclu.

T-apă (°C)	T-local (°C)	T-min (°C)	T-max (°C)
15	18	12,75	23,68
15	20	13,57	23,68
15	22	14,38	23,68
15	24	14,99	23,69
15	26	14,91	23,69
20	18	15,65	28,84
20	20	16,47	28,84
20	22	17,28	28,84
20	24	18,10	28,84
20	26	18,913	28,84
25	18	18,56	33,99
25	20	19,37	33,99
25	22	20,19	33,99
25	24	21,0	33,99
25	26	21,82	33,99
27	15	18,5	36
27	27	23,38	36,05

Intr-o altă variantă de realizare a primului obiectiv, dispozitivul mai conține un mijloc de decontaminare. Mijloacele de decontaminare pot prevedea curățarea generală, așa cum se cere la orice dispozitiv utilizat pentru a produce produs biologic farmaceutic, și/sau pot fi utilizate pentru a steriliza dispozitivul în cazul unei rupturi a pungii pentru probe.

Intr-o altă variantă de realizare, dispozitivul mai conține un mijloc de monitorizare a stării de inactivare a probei (SISM). Mijloacele SISM pot conține ace sau alte dispozitive de sondare adecvate adaptate pentru a elimina aseptice porțiunile de probe definite (din pungile pentru probe), la momente potrivite pe tot parcursul procesului de inactivare hiperbarică. Astfel, mijloacele SISM pot asista utilizatorul dispozitivului în determinarea atingerii inactivării complete a microorganismului. Mijloacele SISM mai pot include orice număr de analize de determinare a viabilității automatizate utile pentru determinarea stării de inactivare a microorganismelor. Dispozitivul poate fi proiectat pentru a ajusta în mod automat condițiile de temperatură și timp pe baza unor date generate de mijloacele SISM.

În exemplele de realizare, în care nu sunt incluse mijloace SISM, cinetica de inactivare este determinată de la caz la caz, stocată și re-utilizată după cum este necesar. În timpul evaluării QC după inactivare, probele pot fi considerate ca fiind inactivate necorespunzător, și pot fi supuse la runda (runde) suplimentară(e) de inactivare. Datele QC pot fi stocate pentru a ajusta cinetica de inactivare pentru un anumit tip și concentrație de microorganisme.

Dispozitivul are în mod necesar cel puțin o interfață utilizator programabilă a calculatorului. Interfața calculatorului permite utilizatorului dispozitivului să controleze toate funcțiile dispozitivului. Interfața controlează cel puțin un mijloc de stocare a datelor, care înregistrează toate datele obținute în cursul ciclurilor de inactivare, incluzând, dar nelimitându-se la, temperatura mantalei, temperatura apei și starea de inactivare a probei. Interfața poate afișa informațiile în formă de grafice, scoase la un mijloc de reprezentare vizuală, și/sau afișa datele într-un tabel de format mare convenabil pentru utilizator sau altă aplicație software de prelucrare a datelor adecvată.

Un al doilea obiectiv al prezentei descrieri este de a oferi metode pentru inactivarea microorganismelor păstrând în același timp imunogenitatea lor. Într-o variantă de realizare, metoda include etapele de supunere a microorganismelor la condiții hiperbarice la temperaturi controlate pentru anumite perioade de timp. Metoda poate include, de asemenea, etapele de alternare între presiuni mai mari și mai mici pentru anumite perioade de timp și la temperaturi specifice. Modelarea valorii extensive a fost efectuată, care este descrisă în continuare în descrierea detaliată de mai jos. În general, temperatura camerei a fost de la 15°C până la 26°C, iar temperatura apei din dispozitiv a fost de la 15°C până la 27°C.

Intr-o altă variantă de realizare a celui de-al doilea obiectiv, microorganismele sunt complet inactivate și incapabile de a provoca infecție, dar sunt capabile de a provoca un răspuns imun la un animal susceptibil la acesta. Într-o variantă de realizare, răspunsul imun este un răspuns imun protector. Într-o altă variantă de realizare, microorganismele sunt chiar mai imunogene decât aceleași microorganisme care au fost inactivate chimic. Într-o încă altă variantă de realizare, microorganismele sunt mai imunogene pentru ca tratamentul hiperbaric a demascat un epitop imunogen.

Un al treilea obiectiv al descrierii este de a furniza metode pentru determinarea stării de inactivare a microorganismelor în timpul și după realizarea metodelor de inactivare hiperbarice. Starea de inactivare poate fi determinată prin orice număr de analize de determinare a viabilității și poate fi utilizată pentru a ajusta și optimiza parametrii de inactivare hiperbarici (adică presiunea, temperatura, timpul). Integritatea și/sau disponibilitatea epitopului poate fi, de asemenea, monitorizată și evaluată pentru a determina parametrii optimi de inactivare.

Un al patrulea obiectiv al descrierii este de a furniza compoziții imunogene care conțin microorganisme inactivate hiperbaric. Într-o variantă de realizare, compozițiile imunogene sunt compoziții de vaccin, care provoacă in vivo la un animal un răspuns imun protector. Compozițiile pot fi mai sigure și mai eficiente decât compozițiile comparabile produse cu utilizarea microorganismelor inactivate chimic. Într-o variantă de realizare, vaccinurile conțin *Leptospira* sau *Erysipelothrix rhusiopathiae* inactivate hiperbaric.

Deoarece dispozitivul hiperbaric descris poate fi utilizat pentru a inactiva o varietate largă de microorganisme, compozițiile care conțin orice microorganism astfel inactivat sunt contemplate de prezenta descriere.

Un al cincilea obiectiv al descrierii este de a furniza metode care includ utilizarea dispozitivului hiperbaric pentru a replică/solubiliza proteinele pentru diverse aplicații biologice moleculare. Într-o variantă de realizare, prezenta descriere se referă la o metodă pentru producerea unei proteine solubile, dezagregate, repliate sau active, exprimate în procariote sau eucariote care cuprinde etapele de (i) preparare a incluziunilor virale într-un tampon care nu conține sau conține o concentrație scăzută de uree pentru a forma o suspensie de incluziuni virale; și (ii) supunere a suspensiei de incluziuni virale la o presiune înaltă pentru o perioadă de timp.

În altă variantă de realizare, prezenta descriere se referă la o metodă de producere a unei proteine solubile, dezagregate, repliate sau active, exprimate în procariote sau eucariote care cuprinde etapele de (i) preparare a incluziunilor virale într-un tampon care nu conține sau conține o concentrație scăzută de uree pentru a forma o suspensie de incluziuni virale; și (ii) supunere a suspensiei de incluziuni virale la o presiune înaltă pentru o perioadă de timp; și (iii) menținere a presiunii înalte aplicate la incluziunile virale pentru o perioadă de timp.

Intr-un aspect, soluția tampon poate conține Ditiotreit (DTT). Într-un alt aspect, concentrația DTT poate varia de la aproximativ 1 mM până la aproximativ 100 mM, aproximativ 1 mM până la aproximativ 90 mM, aproximativ 1 mM până la aproximativ 70 mM, aproximativ 1 mM până la aproximativ 60 mM, aproximativ 1 mM până la aproximativ 50 mM sau aproximativ 1 mM, 2 mM, 3 mM, 4 mM, 5 mM, 6 mM, 7 mM, 8 mM, 9 mM, 10 mM, 20 mM, 30 mM, 40 mM, 50 mM. Într-un aspect, ureea poate să nu fie prezentă în soluția tampon. Într-un alt aspect, ureea poate fi prezentă în soluția tampon la o concentrație de aproximativ 1M, aproximativ 2M, aproximativ 3M, aproximativ 4M, aproximativ 5M, aproximativ 6M, aproximativ 7M, aproximativ 8M, aproximativ 9 M și aproximativ 10M.

Intr-un alt aspect, presiunea înaltă poate fi în intervalul de la aproximativ 1000 bari până la aproximativ 5000 bari, de la aproximativ 2000 bari până la aproximativ 4000 bari. Presiunea înaltă poate fi orice presiune în intervalul de la aproximativ 2000 de bari până la aproximativ 4000 de bari, de exemplu, dar nu limitativ la 2000 de bari, 2100 de bari, 2200 de bari, 2300 de bari, 2400 de bari, 2500 de bari, 2600 de bari, 2700 de bari, 2800 de bari, 2900 de bari, 3000 de bari, 3100 de bari, 3200 de bari, 3300 de bari, 3400 de bari, 3500 de bari, 3600 de bari, 3700 de bari, 3800 de bari, 3900 de bari și 4000 de bari.

Intr-un alt aspect, creșterea treptată a presiunii poate fi efectuată continuu sau treptat. Într-un aspect, creșterea treptată a presiunii este aplicată la suspensia de incluziuni virale, prin creșterea continuă a presiunii la o viteză constantă pe o perioadă de timp pentru a atinge presiunea înaltă finală dorită. De exemplu, presiunea este crescută la rata de aproximativ 200 bari/min – 1000 bari/min continuu timp de aproximativ 2 minute – 10 min pentru a ajunge 2000 de bari, la o rată de aproximativ 200 bari/min – 1000

bari/min continuu timp de aproximativ 3 min – 15 min pentru a atinge 3000 de bari, la o rată de aproximativ 200 bari/min – 1000 bari/min continuu timp de aproximativ 4 minute – 20 min pentru a atinge 4000 de bari, la o rată de aproximativ 200 bari/min – 1000 bari/min continuu timp de aproximativ 5 minute – 25 de minute pentru a atinge 5000 de bari. Intr-un alt aspect, creșterea treptată a presiunii este aplicată în trepte. De exemplu, presiunea este crescută la 1000 bari/min timp de un minut pentru a atinge 1000 de bari, atunci presiunea de 1000 de bari este menținută timp de o oră pentru a relaxa proteina, după perioada de relaxare, presiunea este crescută din nou la 1000 bari/min timp de un minut pentru a atinge presiunea înaltă finală dorită de 2000 de bari.

Pentru a atinge presiunea înaltă finală dorită de 3000 de bari, 4000 de bari și 5000 de bari, aceeași creștere treptată a presiunii la 1000 bari/min timp de un minut cu relaxarea intermediară a proteinei timp de o oră poate fi utilizată. De exemplu, presiunea este crescută la 1000 bari/min timp de un minut pentru a atinge 1000 de bari, atunci presiunea de 1000 de bari este menținută timp de o oră pentru a relaxa proteina, presiunea este crescută din nou la 1000 bari/min timp de un minut pentru a atinge presiunea de 2000 de bari, atunci presiunea de 2000 de bari este menținută timp de o oră pentru a relaxa proteina pentru a doua oară, presiunea este crescută din nou la 1000 bari/min timp de un minut pentru a atinge presiunea finală dorită de 3000 de bari. Pentru a atinge presiunea finală dorită de 4000 de bari, presiunea este crescută la 1000 bari/min timp de un minut pentru a atinge 1000 de bari, atunci presiunea de 1000 de bari este menținută timp de o oră pentru a relaxa proteina, presiunea este crescută din nou la 1000 bari/min timp de un minut pentru a atinge presiunea de 2000 de bari, atunci presiunea de 2000 de bari este menținută timp de o oră pentru a relaxa proteina pentru a doua oară, presiunea este crescută din nou la 1000 bari/min timp de un minut pentru a atinge presiunea finală dorită de 3000 de bari, atunci presiunea de 3000 de bari este menținută timp de o oră pentru a relaxa proteina pentru a treia oară, presiunea este crescută din nou la 1000 bari/min timp de un minut pentru a atinge presiunea finală dorită de 4000 de bari.

Suspensia de incluziuni virale poate fi tratată sub presiunea înaltă timp de aproximativ 10 ore până la aproximativ 100 de ore, aproximativ 20 de ore până la aproximativ 100 de ore. Tratamentul cu presiune înaltă este, de preferință, efectuat timp de mai mult de 24 de ore, de exemplu, aproximativ 25 de ore până la aproximativ 100 de ore, aproximativ 25 de ore până la aproximativ 80 de ore, aproximativ 25 de ore până la aproximativ 60 de ore, aproximativ 25 de ore până la aproximativ 50 de ore, aproximativ 25 de ore, aproximativ 26 de ore, aproximativ 27 de ore, aproximativ 28 de ore, aproximativ 29 de ore, aproximativ 30 de ore, aproximativ 31 de ore, aproximativ 32 de ore, aproximativ 33 de ore, aproximativ 34 de ore, aproximativ 35 de ore, aproximativ 36 de ore, aproximativ 37 de ore, aproximativ 38 de ore, aproximativ 39 de ore, aproximativ 40 de ore, aproximativ 41 de ore, aproximativ 42 de ore, aproximativ 43 de ore, aproximativ 44 de ore, aproximativ 45 de ore, aproximativ 46 de ore, la aproximativ 47 de ore, aproximativ 48 de ore, aproximativ 49 de ore, aproximativ 50 de ore.

În altă variantă de realizare, prezenta invenție prevede o metodă pentru producerea unei proteine solubile, dezagregate, repliate sau active, exprimate în procariote sau eucariote care cuprinde etapele de (i) preparare a incluziunilor virale într-un tampon care nu conține sau conține o concentrație scăzută de uree pentru a forma o suspensie de incluziuni virale; și (ii) supunere a suspensiei de incluziuni virale la o presiune înaltă pentru o perioadă de timp; și (iii) menținere a presiunii înalte aplicate la incluziunile virale pentru o perioadă de timp; și (iv) restabilirea proteinei prin depresurizare.

Proteina poate fi selectată dintre proteinele membranare, antigeni de suprafață sau orice proteină de interes antigenic, incluzând, dar fără a se limita la, proteinele membranare *Leptospira* și proteinele de suprafață *Bordetella*.

Depresurizarea poate fi efectuată la rata de circa 83 bari/min – 200 bari/min. Procariotele contemplate în prezenta invenție pot include *Avibacterium*, *Brucella*, *Escherichia coli*, *Haemophilus* (de exemplu, *Haemophilus suis*), *Salmonella* (de exemplu, *Salmonella enteritis*, *Salmonella typhimurium*, *Salmonella infantis*), *Shigella*, *Pasteurella* și *Rimeirella*.

În sistemele procariote, un număr de vectori de expresie poate fi selectat. Astfel de vectori includ, dar nu sunt limitați la, vectori de expresie și clonare a *E. coli* multifuncționali, cum ar fi pBLUESCRIPT (Stratagene); vectori pIN (Van Heeke & Schuster, J. Biol Chem 264:5503-5509 (1989)); și alții asemenea; vectori PGEX (Promega, Madison, Wis.). În sistemele eucariote, liniile de celule pot fi drojdii (cum ar fi *Saccharomyces cerevisiae*, *Pichia pastoris*), celule de baculovirus, celule de mamifere, celule de plante. Vectorii de expresie ai sistemelor eucariote includ, dar nu sunt limitați la, vectorii pVR1020 sau pVT1012 (Vical Inc., San Diego, CA), vectorul PichiaPink (Invitrogen, CA, USA), vectorul pFasBac TOPO (Invitrogen).

Metoda pentru producerea unei proteine solubile, dezagregate, repliate sau active, exprimate în procariote sau eucariote prevăzută în prezenta invenție poate fi utilizată pentru a solubiliza orice proteine. Proteinele pot include anticorpi și insulină. Proteinele pot include, de asemenea, orice proteine terapeutice, inclusiv factori de coagulare, hormoni peptidici și alții asemenea.

În altă variantă de realizare, prezenta invenție prevede o compoziție sau vaccin care conține un microorganism inactivat hiperbaric, inclusiv virus. Microorganismul poate, de exemplu, să fie un protozoar (de exemplu giardia, tripanosoma, amiba, malarie terță fulminantă și altele asemenea), un virus (de exemplu PCV2, Rota, West Nile, FMD, alienație mintală, rabie, gripă, herpes, diaree, bovine, boală a bursei sinoviale infecțioasă, rinită infecțioasă, adenovirus, poxvirus și altele asemenea), sau o bacterie (*Erysipelothrix rhusiopathiae*, *E. coli*, stafilococ, coccidii, streptococ, mioplasmă hiopneumonică, helicobacter și altele asemenea), și un purtător, excipient, vehicul sau adjuvant acceptabil farmaceutic sau veterinar.

În altă variantă de realizare, prezenta invenție prevede o metodă pentru inactivarea hiperbarică a unei suspensii de celule de *Bordetella pertussis* (*B. pertussis*) care cuprinde etapele de:

(a) producere a unei suspensii de celule de *Bordetella pertussis* într-un mediu de cultură,

(b) concentrare a suspensiei de celule produse în mediul de cultură menționat, opțional suplimentat cu soluție fiziologică (0,9% NaCl) sau o soluție-tampon care nu depășește 25% din volumul final (V/V),

(c) încălzire a suspensiei de celule concentrată la o temperatură cuprinsă între 50°C și 54°C, și

(d) inactivare a suspensiei de celule concentrate tratate termic prin tratarea cu presiune înaltă, în care presiunea înaltă este mai mare de 2000 de bari, dar mai mică de 6000 de bari.

Orice mediu lichid convenabil pentru cultura de *B. pertussis* poate fi utilizat. Acesta poate fi, în special, mediul Cohen Wheeler (American Journal of Public Health, 1946, 36, 371-376), mediul Verwey (J.Bacteriol 1949, 58:127-134) sau un mediu definit chimic astfel cum este descris de Stainer D.W. et al. (Journal of General Microbiology 1971, 63, 211-220). De preferință mediul lichid este mediul Cohen Wheeler care derivă din mediul fluid original Horni-brooks și s-a dovedit a fi deosebit de adecvat pentru cultivarea pe scară largă a *B. pertussis*. Compoziția mediului Cohen Wheeler conține o sursă de azot cum ar fi acizi Casamino sau hidrolizat de cazeină, un amestec de săruri anorganice (fosfat monopotasic, clorură de magneziu, clorură de calciu, sulfat feros, sulfat de cupru), amidon solubil, un extract de drojdie și un derivat al cisteinei selectat din grupul constând din cisteină, o sare a cisteinei precum hidrociorura de cisteină, hidrociorura de cistină și glutatone. Opțional compoziția Cohen Wheeler poate conține componente suplimentare, cum ar fi aminoacizi și/sau clorură de sodiu. De obicei extractul de drojdie este sub forma unui extract de drojdie hidrolizată sau un extract de drojdie autolizată și a fost dializat sau ultrafiltrat.

Suspensia de *B. pertussis* produsă se recoltează și se concentrează, de exemplu prin centrifugare și resuspendarea peletei de celule cu un volum redus de supernatant de cultură care este opțional suplimentat cu soluție fiziologică (0,9% NaCl) sau o soluție tampon, cum ar fi o soluție-tampon fosfat, care nu depășește 25% din volumul final (V/V) sau prin filtrare cu flux tangențial, astfel încât concentrația finală a celulelor este de obicei între 109 și 1013 UFC/mL. De obicei, volumul final al suspensiei de celule concentrate este 10 până la 20 de ori mai mic decât volumul recoltei. Suspensia concentrată de *B. pertussis* se încălzește apoi la o temperatură controlată cuprinsă între 50° și 54°C (limitele inclusiv) pentru o perioadă de timp care reduce viabilitatea celulară a unui factor la aproximativ 10⁴ până la 10⁶ (măsurată în CFU/mL), precum și toxicitatea toxinelor pertussis prevenind în același timp denaturarea termică a proteinelor. Acest efect poate fi obținut prin încălzirea suspensiei concentrate timp de 30 minute la o temperatură controlată între 50° și 54°C (limitele inclusiv). De preferință, perioada de timp în care temperatura este între 38°C și 54°C este, de asemenea, luată în considerare la încălzirea suspensiei concentrate. De exemplu, perioada de timp în care suspensia concentrată este încălzită între 38°C și 54°C, care include perioada de 30 de minute în care temperatura este cuprinsă între 50° și 54°C poate dura între 40 și 90 de minute sau între 50 și 80 de minute, sau chiar între 55 și 70 de minute (limitele inclusiv). Setarea acestor parametri de temperatură poate fi monitorizată cu ușurință de un program automat de încălzire controlată în conformitate cu care temperatura suspensiei de celule concentrate este crescută treptat de la 38°C la 50° în decursul unei perioade de timp definite (de exemplu 10 până la 20 de minute), urmată de o perioadă de timp de 30 de minute, în care temperatura este menținută între 50 și 54°C (limitele inclusiv) și în final o perioadă de timp definită (de exemplu 10 până la 20 de minute) în care temperatura suspensiei de celule concentrate este scăzută treptat de la 50°C până la 38°C.

Suspensia de celule concentrată și tratată termic de *B. pertussis* este în cele din urmă complet inactivată prin tratament hiperbaric în condiții care păstrează imunogenitatea tuturor bacteriilor inactivate. Acest efect este obținut prin supunerea suspensiei de celule concentrate și tratate termic la o presiune înaltă, care este mai mare de 2000 de bari, dar mai mică de 6000 de bari, folosind în special dispozitivul hiperbaric din prezenta invenție. Aceasta poate fi, de exemplu, dar nu limitativ la 2500 de bari, 3000 de bari, 3500 de bari, 4000 de bari, 4500 de bari, 5000 de bari, 5500 de bari. Cu cât presiunea este mai înaltă cu atât mai scurtă este perioada necesară pentru tratamentul cu presiune înaltă. Mai precis, presiunea înaltă poate fi orice presiune în intervalul de la 3000 de bari până la 5000 de bari (limitele incluse), de exemplu, dar nu limitativ la 3000 de bari, 3100 de bari, 3200 de bari, 3300 de bari, 3400 de bari, 3500 de bari, 3600 de bari, 3700 de bari, 3800 de bari, 3900 de bari, 4000 de bari, 4100 de bari, 4200 de bari, 4300 de bari, 4400 de

bari, 4500 de bari, 4600 de bari, 4700 de bari, 4800 de bari, 4900 de bari, 5000 de bari. In acest interval de presiune înaltă, tratamentul cu presiune înaltă este de cel puțin 15 minute, dar de obicei durata este în intervalul de la 15 minute până la 180 de minute și se ajustează în funcție de puterea presiunii înalte care este aplicată la suspensia de celule concentrată și tratată termic. Când presiunea înaltă care se aplică este de 3000 de bari, tratamentul cu presiune înaltă trebuie să dureze mai mult de 30 de minute, de exemplu 90 de minute, 100 de minute, 110 minute, 120 de minute, 130 de minute, 140 de minute, 150 de minute, 160 de minute, 170 de minute sau 180 de minute. Pe de altă parte, atunci când presiunea înaltă care trebuie aplicată este în intervalul de la 4000 de bari până la 5000 de bari (limitele incluse) durata tratamentului cu presiune înaltă poate fi scurtată, de exemplu 30 de minute sau chiar mai puțin, dar din precauție se recomandă de a trata în timpul unei perioade de timp de la 30 de minute până la 180 de minute. Acesta poate fi, de exemplu, dar nu limitativ de 30 de minute, 40 de minute, 50 de minute, 60 de minute, 70 de minute, 80 de minute, 90 de minute, 100 de minute, 110 minute, 120 de minute, 130 de minute, 140 de minute, 150 de minute, 160 de minute, 170 de minute sau 180 de minute, de exemplu un tratament timp de 90 de minute la 4000 de bari. In acest interval de presiune înaltă și perioadă de timp, s-a observat o lipsă a fenomenului de restabilire, ceea ce înseamnă că inactivarea bacteriilor este ireversibilă și definitivă, deoarece nu există bacterii mai viabile după o perioadă de repaus.

Suspensia concentrată complet inactivată de *B. pertussis* obținută prin combinația de tratament termic și tratament hiperbaric conform procedului invenției își păstrează proprietățile imunogene bune, deoarece eficacitatea sa este bine conservată și comparabilă cu cea a unui vaccin de referință calibrat comparabil cu standardul internațional pentru vaccinul *Pertussis* sau un vaccin standard echivalent aprobat de către autoritatea internațională de reglementare. Toxinele din preparat sunt bine neutralizate deoarece testul de adăugare în greutate pe șoareci dă rezultate satisfăcătoare. Observația prin microscopie electronică de scanare arată că nu există modificări morfologice vizibile în populația de bacterii inactivate după tratamentele termic și hiperbaric. Este în principal preparată din bacterii întregi inactivate fără proporție semnificativă a bacteriilor litice și arată ca populația de bacterii care au fost inactivate prin tratament chimic cu mertiolat. Mai mult decât atât, procedeul invenției poate fi ușor realizat la scară industrială, deoarece dispozitivul hiperbaric al invenției a fost conceput pentru a trata volume importante de material biologic (50 de litri sau mai mult). Procedeul, conform invenției, reprezintă o bună alternativă la inactivarea chimică clasică a *B. pertussis* prin mertiolat și reprezintă o nouă oportunitate pentru fabricarea unui vaccin *Pertussis* cu celulă întreagă inactivată. Prin urmare, un alt obiectiv al prezentei invenții se referă la un procedeu pentru fabricarea unui vaccin *Pertussis* cu celulă întreagă care cuprinde etapele de 1) inactivare a unei suspensii de celule concentrate de *Bordetella pertussis* prin tratamente termic și hiperbaric astfel cum este descris în invenție și 2) diluare a suspensiei de celule inactivate concentrate de *B. pertussis* într-un excipient acceptabil farmaceutic înainte de a fi divizat în dispozitive de ambalare.

Purtătorii, adjuvantul sau vehiculele sau excipienții acceptabili farmaceutic sau veterinar sunt bine cunoscuți specialiștilor în domeniu. Purtătorii, adjuvantul sau vehiculele sau excipienții acceptabili farmaceutic sau veterinar care pot fi utilizați pentru metodele din această invenție includ, dar nu sunt limitați la, soluție de NaCl de 0,9% (de exemplu, soluție salină) sau o soluție-tampon fosfat, poli-(L-glutamat) sau polivinilpirolidonă. Purtătorul sau vehiculul sau excipienții acceptabili farmaceutic sau veterinar pot fi orice compus sau combinație de compuși care facilitează administrarea vectorului (sau proteina exprimată dintr-un vector inventiv in vitro), sau facilitează transfecția sau infecția și/sau îmbunătățește conservarea vectorului (sau proteinei). Dozele și volumele dozelor sunt discutate aici în descrierea generală și pot fi, de asemenea, determinate de către specialiștii în domeniu din această descriere coroborată cu cunoștințele din domeniu, fără nici o experimentare exagerată.

Vaccinul cu subunitate (proteină) poate fi combinat cu adjuvanți, cum ar fi emulsii ulei-in-apă, apă-in-ulei-in-apă pe bază de ulei mineral și/sau ulei vegetal și surfactanți neionici, cum ar fi bloc-copolimerii, TWEEN®, SPAN®. Astfel de emulsii sunt în special cele descrise în pagina 147 din "Vaccine Design – The Subunit and Adjuvant Approach", Pharmaceutical Biotechnology, 1995, sau emulsii TS, în special emulsia TS6, și emulsii LF, în special emulsia LF2 (atât ambele emulsii TS și LF, a se vedea WO 04/024027). Alți adjuvanți adecvați sunt, de exemplu vitamina E, saponine și Carbopol® (Noveon; a se vedea WO 99/51269, WO 99/44633), hidroxid de aluminiu sau fosfat de aluminiu ("Vaccine Design, The subunit and adjuvant approach," Pharmaceutical Biotechnology, vol. 6, 1995), adjuvanți biologici (de exemplu C4b, în special C4b murin (Ogata RT et al.) sau C4b, GM-CSF cabalin, în special GM-CSF cabalin (US 6645740)), toxine (adică toxinele holerice CTA sau CTB, toxine termolabile Escherichia coli LTA sau LTB (Olsen C W et al.; Fingerut E et al.; Zurbriggen R et al. Peppoloni S et al.), și CpG (adică CpG # 2395 (a se vedea Jurk M et al.), CpG # 2142 (a se vedea SEQ. ID. NO: 890 in EP 1,221,955)). Alți adjuvanți includ poli A-poli U, bromură de dimetildioctadecilamoniu (DDA) ("Vaccine Design The Subunit and Adjuvant Approach", edited by Powell and Newman, Pharm. Biotech., 6: p.03, p.157); N,N-dioctadecil-N',N'-bis(2-hidroxietil)propandiamină (cum ar fi AVRIDINE®) (Ibid, p.148) și carbomer, chitozan (a se vedea brevetul

US 5980912, de exemplu); polimeri ai acidului acrilic sau metacrilic, anhidridă maleică și polimeri derivativi ai alchenilului, lipide cationice care conțin o sare cuaternară de amoniu, citochine. Orice combinație de adjuvanți poate fi de asemenea utilizată.

Intr-o variantă de realizare, o soluție de adjuvant, în special de carbomer (Pharmeuropa, vol. 8, No.2, June 1996), se prepară în apă distilată, în mod avantajos în prezența clorurii de sodiu, soluția obținută fiind la un pH acid. Această soluție-mamă se diluează prin adăugarea ei la cantitatea dorită (pentru obținerea concentrației finale dorite), sau a unei părți substanțiale a acesteia, de apă încărcată cu NaCl, în mod avantajos cu soluție fiziologică (NaCl 9 g/l) toate în același timp în câteva porțiuni cu neutralizarea concomitentă sau ulterioară (pH 7,3 până la 7,4), în mod avantajos cu NaOH. Această soluție la pH fiziologic este utilizată pentru amestecarea cu vaccinul, care poate fi stocată în special în formă liofilizată, lichidă sau congelată. Concentrația polimerului în compoziția de vaccin finală poate fi de la 0,01% până la 2% m/v, 0,06 până la 1% m/v sau 0,1 până la 0,6% m/v.

Un alt aspect al invenției se referă la o metodă pentru inducerea unui răspuns imunologic la un animal împotriva unuia sau mai multor antigeni sau un răspuns protector la un animal împotriva unuia sau mai multor agenți patogeni, metodă dată cuprinde inocularea animalului ului cel puțin o dată cu vaccinul sau compoziția farmaceutică conform prezentei invenții. Un alt aspect al invenției se referă la o metodă pentru inducerea unui răspuns imunologic la un animal la unul sau mai multe antigeni sau un răspuns protector la un animal împotriva unuia sau mai multor agenți patogeni *Leishmania* într-o schemă de prime-boost administrare, care include cel puțin o administrare primară și cel puțin o booster-administrare utilizând cel puțin o polipeptidă, antigen, epitop sau imunogen comun. Compoziția imunologică sau vaccinul utilizat în administrarea primară poate fi același, poate fi de natură diferită de cele utilizate ca un booster. Administrarea primară poate cuprinde una sau mai multe administrări. În mod similar, booster-administrarea poate cuprinde una sau mai multe administrări. Administrările prime-boost pot fi efectuate 2 până la 6 săptămâni, de exemplu, aproximativ 3 săptămâni. Conform unei variante de realizare, un booster semi-annual sau un booster anual, în mod avantajos utilizând vaccinul subunitar (proteina) este de asemenea preconizat.

O varietate de căi de administrare pot fi utilizate în afară de subcutanat sau intramuscular, cum ar fi intradermic sau transdermic.

Compoziția sau vaccinul conform invenției conține sau constă esențial din sau constă dintr-o cantitate eficientă pentru a obține un răspuns terapeutic de una sau mai multe polipeptide astfel cum este descris în prezentul document; și, o cantitate eficientă poate fi determinată din această descriere, incluzând documentele încorporate aici, cât și cunoștințele din domeniu, fără experimentare exagerată.

Pentru compoziția sau vaccinul care conține proteina exprimată conform prezentei invenții, o doză poate include, de la aproximativ 1 μg până la aproximativ 2000 μg, aproximativ 5 μg până la aproximativ 1000 μg, aproximativ 10 μg până la aproximativ 100 μg, aproximativ 20 μg până la aproximativ 1000 μg, aproximativ 30 μg până la aproximativ 500 μg, sau aproximativ 50 μg până la aproximativ 500 μg. Volumele de doze pot fi între aproximativ 0,1 ml până la aproximativ 10 ml, sau între aproximativ 0,2 ml până la aproximativ 5 ml.

Prin „antigen” sau „imunogen” se înțelege o substanță care induce un răspuns imun specific la un animal gazdă. Antigenul poate cuprinde un organism întreg, ucis, atenuat sau viu; o subunitate sau porțiune a unui organism; un vector recombinant care conține o inserție cu proprietăți imunogene; o bucată sau fragment de ADN capabil de a induce un răspuns imun la prezentarea la un animal gazdă; o polipeptidă, un epitop, o haptenă, sau orice combinație a acestora. Alternativ, imunogenul sau antigenul poate cuprinde o toxină sau antitoxină.

Termenii „proteină”, „peptidă”, „polipeptidă” și „fragment polipeptidic” sunt utilizați interschimbabil în prezenta descriere pentru a se referi la polimeri ai resturilor de aminoacizi de orice lungime. Polimerul poate fi liniar sau ramificat, acesta poate cuprinde aminoacizi modificați sau analogi ai aminoacizilor și poate fi întrerupt de fragmente chimice altele decât aminoacizi. Termenii includ, de asemenea, un polimer al aminoacidului care a fost modificat în mod natural sau prin intervenție; de exemplu formare a legăturii disulfurice, glicozilare, lipidare, acetilare, fosforilare sau orice altă manipulare sau modificare, cum ar fi conjugarea cu un component bioactiv sau marcat.

Termenul „polipeptidă imunogenă sau antigen”, astfel cum este utilizat în prezenta descriere, include polipeptide care sunt imunologic active în sensul că odată administrate la gazdă, sunt capabile să evoce un răspuns imun de tip umoral și/sau celular îndreptat împotriva proteinei. De preferință, fragmentul de proteine este de așa natură încât are substanțial aproape aceeași activitate imunologică ca și proteina totală. Astfel, un fragment de proteină, conform invenției cuprinde sau constă esențial din sau constă din cel puțin un epitop sau determinant antigenic. O proteină sau polipeptidă „imunogenă”, astfel cum este utilizată în prezenta descriere, include secvența de lungime întreagă a proteinei, analogi ai acesteia sau fragmente imunogene ale acesteia. Prin „fragment imunogen” se înțelege un fragment al unei proteine care include

unul sau mai mulți epitopi și astfel provoacă răspunsul imunologic descris mai sus. Astfel de fragmente pot fi identificate utilizând orice număr de tehnici de cartografiere a epitopilor, bine cunoscute în domeniu. (A se vedea, de exemplu, Epitope Mapping Protocols in Methods in Molecular Biology, Vol. 66 (Glenn E. Morris, Ed., 1996). De exemplu, epitopii liniari pot fi determinați prin, de exemplu, sintetizarea concomitent a un număr mare de peptide pe suporturi solide, peptide corespunzătoare porțiunilor moleculei proteice, și reacția peptidelor cu anticorpi în timp ce peptidele sunt încă legate la suporturi. Astfel de tehnici sunt cunoscute în domeniu și descrise în, de exemplu, brevetul US 4708871; Geysen et al., 1984; Geysen et al., 1986. În mod similar, epitopii conformaționali sunt ușor identificați prin determinarea conformației spațiale a aminoacizilor, cum ar fi de exemplu, cristalografia cu raze X și rezonanța magnetică nucleară 2-dimensională. Vezi, de exemplu, Epitope Mapping Protocols (Protocoale de cartografiere a epitopilor), supra. Metodele aplicate în special la proteinele de *T. parva* sunt descrise complet în PCT/US2004/022605 încorporate aici prin referință în întregime.

Astfel cum s-a discutat aici, invenția cuprinde fragmente active și variante ale polipeptidei antigeni. Astfel, termenul „polipeptidă imunogenă și antigen” descrie suplimentar deleții, adii și substituții la secvență, atât timp cât polipeptida funcționează pentru a produce un răspuns imunologic astfel cum este definit aici. Termenul „variație conservativă” denotă înlocuirea unui rest de aminoacid de către un alt rest biologic similar sau înlocuirea unei nucleotide într-o secvență de acid nucleic astfel încât restul de aminoacid codificat nu se schimbă sau este un alt rest biologic similar. În acest sens, substituțiile preferate în mod particular vor fi în general conservative în natură, adică, acele substituții care au loc în cadrul unei familii de aminoacizi. De exemplu, aminoacizii sunt în general divizați în patru familii: (1) acizi - aspartat și glutamat; (2) bazi - lizină, arginină, histidină; (3) nepolari - alanină, valină, leucină, izoleucină, prolină, fenilalanină, metionină, triptofan; și (4) polari neîncărcați - glicină, asparagină, glutamină, cistină, serină, treonină, tirozină. Fenilalanina, triptofanul și tirozina sunt uneori clasificate ca aminoacizi aromatici. Exemplele de variații conservative includ substituția unui rest hidrofob, cum ar fi izoleucina, valina, leucina sau metionina cu un alt rest hidrofob, sau substituția unui rest polar cu un alt rest polar, cum ar fi substituția argininei cu lizina, acidului glutamic cu acidul aspartic sau glutaminei cu asparagina, și altele asemenea; sau o înlocuire conservativă similară a unui aminoacid cu un aminoacid legat structural care nu va avea un efect major asupra activității biologice. Proteinele care au în mod substanțial aceeași secvență de aminoacizi ca molecula de referință, dar care posedă substituții de aminoacizi minore care nu afectează în mod substanțial imunogenitatea proteinei sunt, prin urmare, în definiția de polipeptidă de referință. Toate polipeptidele produse prin aceste modificări sunt incluse aici. Termenul „variație conservativă” include, de asemenea, utilizarea unui aminoacid substituit în locul unui aminoacid parental nesubstituit, cu condiția ca anticorpii produși la polipeptida substituită să imunoreacționeze cu polipeptida nesubstituită.

Termenul „epitop” se referă la site-ul pe un antigen sau haptenă la care răspund celule B specifice și/sau celule T. Termenul este de asemenea utilizat interschimbabil cu „determinant antigenic” sau „sit antigenic determinant”. Anticorpii care recunosc același epitop pot fi identificați într-o analiză imunologică simplă care arată capacitatea unui anticorp de a bloca legarea unui alt anticorp la un antigen țintă.

Un „răspuns imunologic” la o compoziție sau vaccin este dezvoltarea în gazdă a unui răspuns imun celular și/sau mediată de anticorpi la o compoziție sau vaccin de interes. De obicei, un „răspuns imunologic” include, dar nu se limitează la unul sau mai multe dintre următoarele efecte: producerea de anticorpi, celule B, celule T helper și/sau celule T citotoxice, direcționate în mod specific la un antigen sau antigeni incluse în compoziția sau vaccinul de interes. De preferință, gazda va prezenta fie un răspuns imunologic terapeutic sau protectiv astfel încât rezistența la infecții nou va fi sporită și/sau severitatea clinică a bolii redusă. O astfel de protecție va fi demonstrată fie prin reducerea sau lipsa de simptome și/sau semne clinice ale bolii prezentate în mod normal de o gazdă infectată, un timp de restabilire mai rapidă și/sau un titru viral redus în gazda infectată.

Prin „animal” se înțelege mamifere, păsări și altele asemenea. Termenul de animal sau gazdă, astfel cum este utilizat în prezenta descriere, include mamiferele și omul. Animalul poate fi selectat din grupul constând din cabaline (de exemplu, cal), canine (de exemplu, câini, lupi, vulpi, coioți, șacali), feline (de exemplu, lei, tigri, pisici domestice, pisici sălbatice, alte feline mari, și alte feline, inclusiv gheparzii și rasul), ovine (de exemplu, oi), bovine (de exemplu, vite), porcine (de exemplu, porc), aviare (de exemplu, pui, rață, găscă, curcan, prepeliță, fazan, papagal, cinteze, șoim, cioară, struț, emu și cazuar), primate (de exemplu, prosimian, tarsier, maimuță, gibbon, macac), dihori, foci și pește. Termenul „animal” include, de asemenea, un animal individual în toate etapele de dezvoltare, inclusiv etapele de nou-născut, embrionar și fetal.

Dacă nu se explică altfel, toți termenii tehnici și științifici utilizați aici au aceeași semnificație astfel cum este înțeleasă în general de un specialist în domeniul la care se referă această dezvoltare. Termenii la singular „o” și „un” includ referenții la plural dacă contextul nu indică în mod clar altfel. În mod similar, cuvântul „sau” este destinat să includă „și” dacă contextul nu indică în mod clar altfel.

Compoziții

Prezenta invenție se referă la un vaccin sau compoziție cu microorganism inactivat hiperbaric, care poate conține microorganisme inactivate hiperbaric și un purtător, excipient sau vehicul acceptabil farmaceutic sau veterinar, care provoacă, induce sau stimulează un răspuns la un animal.

Termenul „acid nucleic” și „polinucleotidă” se referă la ARN sau ADN care este liniar sau ramificat, simplu sau dublu catenar, sau un hibrid al acestuia. Termenul cuprinde, de asemenea, hibrizi ARN/ADN. Următoarele sunt exemple nelimitative de polinucleotide: o genă sau fragment al genei, exoni, introni, ARNm, ARNt, ARNr, ribozime, ADNc, polinucleotide recombinante, polinucleotide ramificate, plasmide, vectori, ADN izolat cu orice secvență, ARN izolat cu orice secvență, sonde de acid nucleic și primeri. O polinucleotidă poate cuprinde nucleotide modificate, cum ar fi nucleotide metilate și analogi ai nucleotidelor, uracil, alte zaharuri și grupuri de legătură, cum ar fi fluororibosă și tiolat, și ramuri de nucleotide. Secvența de nucleotide poate fi modificată suplimentar după polimerizare, cum ar fi prin conjugare, cu un component de marcă. Alte tipuri de modificări incluse în această definiție sunt cap-urile, substituția uneia sau mai multor nucleotide care apar în mod natural cu un analog, și introducerea mijloacelor pentru legarea polinucleotidei la proteine, ioni metalici, componente de marcă, alte polinucleotide sau suport solid. Polinucleotidele pot fi obținute prin sinteză chimică sau derivate dintr-un microorganism.

Termenul „genă” este utilizat în sens larg pentru a se referi la orice segment de polinucleotidă asociat cu o funcție biologică. Astfel, genele includ introni și exoni ca în secvența genomică, sau doar secvențe de codificare ca în cADN-uri și/sau secvențele reglatoare necesare pentru expresia lor. De exemplu, gena de asemenea se referă la un fragment de acid nucleic, care exprimă ARNm sau ARN funcțional, sau codifică o proteină specifică, și care include secvențe reglatoare.

Un component biologic „izolat” (cum ar fi un acid nucleic sau proteină sau organelă) se referă la un component care a fost separat în mod substanțial sau purificat de alte componente biologice în celula organismului în care componentul apare în mod natural, de exemplu, alte ADN și ARN cromozomiale și extra-cromozomiale, proteine și organele. Acizii nucleici și proteinele care au fost „izolate” includ acizii nucleici și proteine purificate prin metode standard de purificare. Termenul cuprinde, de asemenea, acizii nucleici și proteinele preparate prin tehnologia recombinantă, precum și sinteza chimică.

Termenul „variație conservativă” denotă înlocuirea unui rest de aminoacid de către un alt rest biologic similar sau înlocuirea unei nucleotide într-o secvență de acid nucleic astfel încât restul de aminoacid codificat nu se schimbă sau este un alt rest biologic similar. În acest sens, substituțiile preferate în mod particular vor fi în general conservative în natură, astfel cum este descris mai sus.

Termenul „recombinant” înseamnă o polinucleotidă cu origine semisintetică sau sintetică care fie nu apare în natură sau este legată la o altă polinucleotidă într-un aranjament care nu se găsește în natură.

„Heterolog” înseamnă derivat dintr-o entitate distinctă genetic de restul entității cu care ea este comparată. De exemplu, o polinucleotidă poate fi plasată prin tehnici de inginerie genetică într-o plasmidă sau vector derivat dintr-o sursă diferită și este o polinucleotidă heterologă. Un promotor îndepărtat din secvența sa nativă de codificare și legat operațional la o secvență de codificare alta decât secvența nativă este un promotor heterolog.

Polinucleotidele, conform invenției, pot cuprinde secvențe adiționale, cum ar fi secvențe de codificare adiționale în aceeași unitate de transcripție, elemente de control, cum ar fi promotorii, ribozomi, situri de fixare a ribozomului, 5'UTR, 3'UTR, terminatoare de transcripție, situri de poliadenilare, unități de transcripție suplimentare sub controlul aceluiași sau diferit promotor, secvențe care permit clonarea, exprimarea, recombinația omoloagă și transformarea unei celule gazdă, și orice astfel de construcție care poate fi dezirabilă pentru a oferi variante de realizare ale acestei invenții.

Metode de utilizare și produsul fabricat

Prezenta invenție include următoarele variante de realizare a metodelor. Intr-o variantă de realizare este dezvăluită o metodă de vaccinare a unui animal, care include administrarea unei compoziții care conține un microorganism inactivat hiperbaric și un purtător, excipient sau vehicul acceptabil farmaceutic sau veterinar la un animal. Intr-un aspect al acestei variante de realizare, animalul este o porcină.

Intr-o variantă de realizare a invenției, o schemă prime-boost poate fi utilizată, care constă din cel puțin o primă administrare și cel puțin o booster-administrare utilizând cel puțin o polipeptidă, antigen, epitop sau imunogen comun. De obicei compoziția sau vaccinul imunologic utilizat în prima administrare este de natură diferită de cele utilizate ca un booster. Cu toate acestea, se remarcă faptul că aceeași compoziție poate fi utilizată ca primă administrare și booster-administrare. Acest protocol de administrare se numește „prime-boost”.

O schemă prime-boost include cel puțin o primă administrare și cel puțin o booster-administrare utilizând cel puțin o polipeptidă comună și/sau variante sau fragmente ale acesteia. Vaccinul utilizat în prima administrare poate fi de natură diferită de cele utilizate ca un booster-vaccin ulterior. Prima

administrarea poate cuprinde una sau mai multe administrări. În mod similar, boost-administrarea poate cuprinde una sau mai multe administrări.

Volumul dozei compozițiilor pentru speciile țintă care sunt mamifere, de exemplu, volumul dozei compozițiilor de porc sau de porcine, pe baza antigenilor bacteriene, este în general între aproximativ 0,1 până la aproximativ 2,0 ml, între aproximativ 0,1 până la aproximativ 1,0 ml și între aproximativ 0,5 ml până la aproximativ 1,0 ml.

Eficacitatea vaccinurilor poate fi testată aproximativ 2 până la 4 săptămâni după ultima imunizare prin infectarea controlată a animalelor, cum ar fi porcine, cu o tulpină virulentă de *Erysipelothrix rhusiopathiae*. Ambele tulpini omologe și heterologe sunt utilizate pentru infectare pentru a testa eficacitatea vaccinului. Animalul poate fi infectat prin injectare IM sau SC, pulverizare, intra-nazal, intra-ocular, intra-traheal și/sau oral. Probele de la articulații, plămâni, creier și/sau gură pot fi colectate înainte și după infectare și pot fi analizate pentru prezența anticorpilor *Erysipelothrix rhusiopathiae*-specfici.

Compozițiile care conțin microorganisme inactivate conform invenției utilizate în protocoalele prime-boost sunt conținute într-un vehicul, diluant sau excipient acceptabil farmaceutic sau veterinar. Protocoalele conform invenției protejează animalul de formele virulente ale microorganismelor și/sau previn progresia bolii la un animal infectat.

Diversele administrări se efectuează, de preferință, 1 până la 6 săptămâni separat. Intervalul de timp preferat este 3 până la 5 săptămâni și optimal 4 săptămâni conform unui variantă de realizare, un booster anual este, de asemenea, preconizat. Animalele, de exemplu porcii, pot fi cel puțin cu vârsta de 3-4 săptămâni la momentul primei administrări.

Un specialist în domeniu trebuie să înțeleagă că descrierea de față este furnizată prin exemplu și prezenta invenție nu este limitată la aceasta. Din descrierea de față și cunoștințele din domeniu, specialiștii în domeniu pot determina numărul de administrări, calea de administrare, precum și dozele, care urmează să fie utilizate pentru fiecare protocol de injectare, fără nici o experimentare exagerată.

O altă variantă de realizare a invenției este un set pentru realizarea metodei de provocare sau inducere a unui răspuns imunologic sau protectiv împotriva unui microorganism la un animal, care cuprinde o compoziție imunologică inactivată hiperbaric sau vaccin și instrucțiuni pentru realizarea metodei de livrare a unei cantități eficiente pentru provocarea unui răspuns imun la animal.

O altă variantă de realizare a invenției este un set pentru realizarea metodei de inducere a unui răspuns imunologic sau protectiv împotriva microorganismelor virulente la un animal, care cuprinde o compoziție sau vaccin care conține un microorganism inactivat hiperbaric, conform invenției, precum și instrucțiuni pentru realizarea metodei de livrare a unei cantități eficiente pentru provocarea unui răspuns imun la animal.

Un alt aspect al prezentei invenții se referă la un set pentru vaccinarea prime-boost, conform prezentei invenții, astfel cum este descris mai sus. Setul poate cuprinde cel puțin două flacoane: un prim flacon care conține un vaccin sau compoziție pentru prima vaccinare, conform prezentei invenții, și un al doilea flacon care conține un vaccin sau compoziție pentru boost-vaccinare, conform prezentei invenții. Setul poate conține în mod avantajos primul sau al doilea flacon suplimentare pentru prima vaccinare suplimentară sau boost-vaccinări suplimentare.

Intr-o variantă de realizare, adjuvanții includ pe cei care promovează absorbția îmbunătățită prin căptușeli ale membranei mucoase. Unele exemple includ MPL, LTK63, toxine, microparticule de PLG și multe altele (Vajdy, M. Immunology and Cell Biology (2004) 82, 617-627). Intr-o variantă de realizare, adjuvantul poate fi un chitozan (Van der Lubben et al. 2001; Patel et al. 2005; Majithiya et al. 2008; US Patent Serial No. 5,980.912). Intr-o variantă de realizare, adjuvantul poate fi bacterii inactivate, un virus inactivat, fracțiuni de bacterii inactivate, lipopolizaharide bacteriene, toxine bacteriene sau derivați sau combinații.

Intr-o variantă de realizare, adjuvantul cuprinde bacterii și/sau virusuri întregi, inclusiv *H. parasuis*, clostridium, virusul imunodeficienței porcine (SIV), circovirusul porcin (PCV), virusul sindromului respirator și reproductiv porcin (PRRSV), Mannheimia, Pasteurella, Histophilus, Salmonella, *Escherichia coli*, sau combinații și/sau variații ale acestora. În mai multe exemple de realizare, adjuvantul mărește producția de IgM, IgG, IgA a animalului, și/sau combinații ale acestora.

Invenția va fi descrisă în continuare prin intermediul următoarelor exemple nelimitative.

EXEMPLUL 1: Dezvoltarea parametrului dispozitivului

Prezenta descriere prevede, în parte, un dispozitiv de înaltă presiune, care 1) inactivează complet microorganisme (făcându-le neinfecțioase); și 2) păstrează și/sau îmbunătățește potențialul imunogen (imunogenitatea) al microorganismelor. Dispozitivele anterioare, concepute pentru a reduce povara microorganismelor în alimente (de exemplu, sucuri) sau materiale biologice (de exemplu, produsele de sange sau Factorul VIII recombinant), nu aveau aceste caracteristici, care sunt critice pentru producerea de componente sigure, eficiente, inactivate hiperbaric ale vaccinului. În timpul stabilirii cineticii de inactivare

a microorganismelor au fost evaluate condițiile de limită, inclusiv extremele de temperatură și presiune, precum și extremele în gradientii de presiune. Antigenicitatea și imunogenitatea microorganismelor inactivate hiperbaric au fost evaluate, de asemenea, pentru a ajuta la definirea cerințelor dispozitivului, cum au fost mecanismele de încălzire/răcire a dispozitivului. Omogenitatea temperaturii de funcționare a dispozitivului a fost, de asemenea, modelată, pentru a dezvolta condițiile optime de inactivare hiperbarică. Determinarea extremelor de temperatură în dispozitiv prin modelare a permis validarea parametrului de inactivare (presiune, timp și temperatură).

Modelarea parametrului. O metoda a elementelor finite cu utilizarea codului de calcul Cats3M a fost elaborată și utilizată pentru a evalua schimbul de căldură într-o cameră de presiune ridicată (câteva sute MPa) pentru inactivarea virusurilor și/sau bacteriilor. Calculul a fost efectuat pe mai multe geometrii ale mantalei axisimetrice 2D pentru a înțelege mai bine efectul configurației mecanice a mantalei asupra răspunsului termic al acestuia din urmă. Scopul studiului a fost de a proiecta un volum mare al mantalei (aproximativ 100L), cu scopul de a limita eterogenitatea temperaturii și pentru a satisface constrângerile mecanismului de inactivare biologică. Procesul de înaltă presiune a fost dezvoltat și studiat pe parcursul a mai multor cicluri de compresie-decompresie, cu un timp de relaxare sub presiune ridicată și la zero presiune.

Algoritmul dezvoltat a permis vizualizarea izotermelor pe tot parcursul procesului. Temperatura medie și eterogenitatea temperaturii în funcție de timp au fost extrase din aceste calcule. Perioada de valabilitate a algoritmului a fost verificată prin comparație cu mai multe studii experimentale. Noi am testat diferite fluide pentru a transmite presiune și am evaluat impactul factorilor, cum ar fi gradul de compresie și de decompresie, temperatura inițială a fluidului care transmite presiune și presiunea maximă atinsă.

Rezultatele indică o bună corespundere cu măsurătorile experimentale și permite profilarea unui protocol experimental și stabilirea geometriei mantalei folosind algoritmul pentru a ghida acest design (o comparație între profilurile de temperatură experimentale și modelate pe o presă izostatică, regimul de funcționare a pistonului cu un volum de ¼ litru). Ambele măsuri converg spre o valoare de circa 0,16% până la Cp (4236 Jg-1.K-1 și 4243 Jg-1.K-1) la o temperatură de 13°C. Acest lucru ne dă la această temperatură o capacitate termică de $4,240 \pm 0,004$ Jg-1.K-1. Căldura specifică a apei la 20°C este de 4,1813 Jg-1.K-1 [4], care este o diferență de 1,4%, cu măsurătorile efectuate asupra produsului biologic care urmează să fie prelucrate prin metoda de presare. Având în vedere diferențele mici în proprietăți fizice între lichidul biologic și apă, aceste rezultate au fost destul de consistente și confirmată, de asemenea, aplicabilitatea modelului la inactivarea hiperbarică a microorganismelor. Astfel, modelarea ciclurilor efectuată pentru apă prin varierea gradului de compresie și decompresie, temperatura inițială a fluidului de transmitere a presiunii, precum și presiunea maximă a fost atinsă, reprezentanta cazului concret de tratare a unui fluid biologic.

Acum, când inventatorii au furnizat prezenta descriere, specialistul va fi capabil să inactiveze cu succes orice număr de microorganisme, prin optimizarea de rutină a parametrilor discutați aici.

EXEMPLUL 2: Eficacitatea la porcine a *Erysipelothrix rhusiopathiae* inactivate hiperbaric.

Erysipelothrix rhusiopathiae a fost inactivată cu ajutorul dispozitivului prezentei dezvoltării. A fost descoperit în mod surprinzător, în timpul eforturilor de a inactiva hiperbaric *E. rhusiopathiae*, că a existat un „fenomen de restabilire”, prin care bacteriile au manifestat capacitatea de ași repara sistemele lor enzimatice după câteva zile de depozitare la temperatura camerei. Prin urmare, a fost necesară ajustarea parametrilor de timp, temperatură și presiune ai dispozitivului hiperbaric pentru a compensa acest fenomen. Mai multe condiții de inactivare au fost investigate, inclusiv la 4000 de bari timp de 90 de minute la 37°C.

O sută de litri de cultură bacteriană de *Erysipelothrix rhusiopathiae* s-a inactivat prin trei metode diferite pentru a produce ingredientele de bază active (IA): 1) timerosal; 2) formaldehidă de sodiu; și 3) hiperbaric (4000 de bari, 90 de minute, 37°C). Probele de la fiecare dintre fracțiunile inactivate au fost caracterizate, precum și proteina SpaA (Antigenul A proteic de suprafață), o proteină cunoscută ca fiind antigenul protectiv al *E. rhusiopathiae*, a fost detectat în toate cele trei fracțiuni, inclusiv fracțiunea inactivată hiperbaric (Ab monoclonal, Western blotting, datele nu sunt prezentate). Serurile de la șoarecii imunizați cu IA conțin trei anticorpi policlonali împotriva acestei proteine. Mai mult, serurile de la porcii vaccinați cu o proteină recombinantă SpaA au avut anticorpi care recunosc proteina SpaA în IA inactivate cu mertiolat și hiperbaric. În final, cele trei IA au fost colorate de un anticorp monoclonal SpaA fluorescent și distribuțiile populațiilor bacteriene marcate/nemarcate au variat semnificativ în funcție de modul de inactivare: 95% din bacterii inactivate hiperbaric au fost marcate, cu o intensitate medie a fluorescenței de 24 unități arbitrare, în timp ce doar 79% din bacterii inactivate cu mertiolat au fost marcate, cu o intensitate medie de numai 7 unități (FIG. 18). Acest rezultat sugerează că inactivarea chimică a deteriorat proteinele antigenice prezente în bacterii.

Testul de vaccinare pe animale de laborator. Șoarecii au fost vaccinați cu fiecare dintre cele trei *Erysipelothrix rhusiopathiae* inactivate (mertiolat, formaldehidă și hiperbaric), apoi infectați cu *E.*

rhusiopathiae vii/virulente prin injectare IP. O sută de procente de șoareci vaccinați cu IA inactivat hiperbaric au supraviețuit infectarea (FIG. 20).

Vaccinarea animalelor ținută: porci. Grupuri de 7 porci au fost vaccinate fie cu bacterii inactivate chimic sau hiperbaric, sau cu o proteină SpaA recombinantă, apoi infectați cu bacterii vii injectate intradermic (datele serologice prezentate în FIG. 23). Aspectul leziunilor cutanate a fost monitorizat, iar vaccinul a fost considerat eficient în cazul în care este pe deplin protejat împotriva formării leziunilor. Toate animalele vaccinate au fost complet protejate împotriva a două tulpini de *E. rhusiopathiae* (serotipurile 1 și 2).

Răspunsul celulelor T indus de E. rhusiopathiae inactivate hiperbaric. Creșterea diluțiilor a trei *E. rhusiopathiae* plasate în prezența celulelor monoclonale ale sângelui periferic (PBMC) de porc vaccinat cu proteina recombinantă și răspunsul celulelor T pentru Antigenii bacteriene specifice SpaA cuantificate utilizând o analiză ELISpot (analiză imunoenzimatică în picătură) au relevat IFN. Acest studiu a arătat un răspuns al celulelor T mai bun la reactivarea *ex vitro* specific pentru antigenul inactivat hiperbaric în toate diluțiile testate. În plus, la 42 de zile după vaccinare, atunci când frecvența celulelor T specifice a scăzut, acest efect a fost și mai pronunțat, sugerând în mod clar o mai bună calitate a antigenului (pentru fracțiunea inactivată hiperbaric).

Cartografierea epitopilor T-celulari. O bancă de peptide ale LOG proteinei a fost utilizată pentru a determina care epitopi T-celulari au fost activați prin diferite bacterii inactivate (ingredient activ, IA). Acest studiu a arătat că unii epitopi au fost mult mai bine recunoscuți de animalele vaccinate cu IA inactivat hiperbaric decât cele vaccinate cu un IA inactivat chimic.

În cele din urmă, serurile de la porcii vaccinați cu diferite preparate de vaccinuri au fost supuse analizei pentru nivelurile de anticorpi specifici împotriva *Erysipelothrix rhusiopathiae*. IgG1 și IgG2 au fost induși, iar printre cele 3 metode de inactivare, titrurile IgG 1 și IgG2 au fost mai mari pentru animalele vaccinate cu bacterie inactivată hiperbaric în comparație cu animalele vaccinate cu bacterii inactivate chimic.

EXEMPLUL 3: Inactivarea hiperbarică a *Leptospira*

Trei tulpini de leptospire de vaccin au fost evaluate pentru inactivarea hiperbarică: *Leptospira canicola*, *Leptospira grippotyphosa* și *Leptospira icterohaemorrhagiae*. Testele preliminare au arătat că bacteriile leptospira au fost inactivate cu succes la o presiune de 2500 de bari, la trei temperaturi de inactivare testate (10°C, 20°C și 30°C). Aceste rezultate confirmă cele obținute de Carla Silva în 2000 (C. Silva *et al.*, 2001). Numeroase publicații s-au axat pe cercetarea și identificarea antigenilor protective în diferite tulpini de leptospire (P. Cullen *et al.*, Infection and Immunity, 2005): lipopolizaharide sau LPS, un component major al suprafeței bacteriilor responsabile pentru testele de antigen și aglutinare ; o proteină transmembranară OmpL1; și lipoproteina ancorată în membrană prin capătul lor N-terminal și care oferă protecție parțială la animalele de laborator: LipL32, LipL36 și LipL41.

Recent, proteinele de suprafață (LigB și LigA) cu repetiții cu 90 de aminoacizi care seamănă cu imunoglobulina au conferit protecție parțială animalelor de laborator pentru analogii de testare (W. Yan *et al.*, Microbes and Infections, 2009). FIG. 9 oferă o reprezentare schematică a antigenilor protectivi presupuși în *Leptospira*. Pentru a caracteriza antigenitatea diferitelor suspensii bacteriene după inactivarea hiperbarică, studiul privind LPS, lipoproteina (LipL32 / 41/46) fixată în membrana externă și factorii de virulență (LigA/B) a fost efectuat pe culturi de trei serotipuri Lepto. Condițiile de tratare a inclus inactivarea neinactivată, chimic-inactivată prin mertiolat de sodiu (0,1 g/l, 24°C până la 29°C) și hiperbarică la 20°C în conformitate cu Tabelul 2.

Tabelul 2. Descrierea diferitelor suspensii de *Leptospira* și condițiile de inactivare. FTU: Unități de turbiditate. FACS: Sortarea celulelor activate prin fluorescență.

	<i>L. icterohaemorrhagiae</i>	<i>L. canicola</i>	<i>L. grippotyphosa</i>
ID	Li84	Lc87	ATCC 23604
O.D. 450nm	0.709	0.53	0.73
FTU	341	256	400
FACS	1.8*10E9 U/ml	1.2*10E9 U/ml	2.4*10E9 U/ml
INACTIVAREA hiperbarică	2500b/60' (inac1)	2500b/60' (inac1)	2500b/60' (inac1) - 2500b/30' (inac2)
Controlul inactivării	-	-	-
INACTIVAREA chimică	Mertiolat 0,1g/L		
Controlul inactivării	-	-	-

Toate condițiile de inactivare testată au condus la inactivarea leptospirelor. Controalele inactivării sunt cele utilizate în mod curent și pragul lor de detectare este cunoscut și suficient de sensibil pentru a detecta o bacterie care trăiește în câțiva mililitri. Pe scurt, probele sunt centrifugate pentru a colecta bacteriile inactivate din precipitat și a înlătura cât mai mult agent de inactivare din supernatant și apoi a livra cultura de pelete în mediul proaspăt. Același mediu este validat printr-un test de viabilitate și identifică creșterea prin însămânțarea doar a 10 bacterii *Leptospira*. După inactivare, studii de antigenitate au fost efectuate folosind trei tipuri de seruri: 1) anti-LPS monoclonal, care nu se intersectează între diferite serotipuri; 2) anticorpi policlonali monospecfici, lipoproteină (LIPL); și 3) anticorpi policlonali specfici pentru ne LigA/B (recunoașterea epitopilor comuni). Tabelul 3 prezintă în detaliu natura diferiților anticorpi.

Tabelul 3: Anticorpi utilizați pentru studiile de antigenitate a *Lepto*. M: Ab monoclonali; P: Ab policlonali.

M(Monoclonal)/P (Policlonal)	LPS	LipL32	LipL41	LipL46	LigA	LigB
LI	M	P	P	P	P	
LC	M	P	P	P	P	
LG	M	P	P	P	P	

O publicație menționează dispariția anumitor proteine membranare după tratamentul hiperbaric (M. Ritz et al, International Journal Of Food Microbiology, 2000) - aceste antigeni vor fi solicitate în suspensiile bacteriene întregi (sau Culturile brute -RB), pelete sau supernatantii din aceste suspensii bacteriene după centrifugare, înainte și după inactivare. Western blot-urile acestor antigeni pentru cele trei tulpini sunt prezentate în FIG. 10-13. Antigenii LipL32, LipL41 și LipL46 (FIG. 10 și 12) au fost recunoscute de anticorpii policlonali pentru toate cele trei tratamente. Inactivarea hiperbarică nu a modificat antigenitatea; cu toate acestea, o anumită degradare a antigenului LipL32 și LipL46 a fost observată după tratamentul hiperbaric, în comparație cu grupurile neinactivate sau inactivate chimic (mai ales pentru *L. grippityphosa*, FIG. 12).

Antigenii LigB și LigA (FIG. 11 și 13) au fost recunoscute de anticorpii policlonali pentru toate cele trei tratamente. Inactivarea hiperbarică nu modifică antigenitatea acestor antigeni, iar fracțiunile de supernatant /precipitat sunt neschimbate pentru toate tratamentele luate în considerare. În final, rezultatele analizelor LPS pentru Li și Lg sunt prezentate în FIG. 14A și B. LPS sunt recunoscute după inactivarea hiperbarică și cantitățile detectate sunt identice înainte și după inactivare. În concluzie, inactivarea hiperbarică a *Leptospira* este eficientă și nu conduce la schimbări în antigenitatea lor.

EXEMPLUL 4: Inactivarea hiperbarică și termică a *Bordetella pertussis*

1) Prepararea unei suspensii concentrate de *B. pertussis*

O probă de liofilizare derivată din tulpina *B. pertussis* furnizată de laboratorul de biologie al Departamentului Sănătății Publice din Boston (Massachusetts - SUA) (Ref 214873M1) a fost preluată în mediu Verwey (J.Bacteriol 1949; 58: 127-34) și utilizată pentru a însămânța un mediu solid Bordet-gengou suplimentat cu 25% de sânge de oaie defibrinat. După incubare (72 de ore la 36°C), bacteriile au fost apoi transferate într-un mediu lichid Verwey suplimentat cu 1 g/l de extract de drojdii autolitice ultra-filtrat (Ref: springer 0701) și cultivate la 36°C, timp de aproximativ 24 de ore. Bacteriile au fost apoi transferate într-un bioreactor umplut cu 4,5 L de un mediu Cohen Wheeler (American Journal of Public health, 1946, 36, 371-376), suplimentat cu 1 g/l de extract de drojdii autolitice ultrafiltrat, pH = 7,3 inițial și cultivată la 35°C cu punctul pO₂ stabilit la 26%. Când densitatea optică a suspensiei de celule a atins 0,4 la 650 nm, o fracțiune din această cultură a fost utilizată pentru a inocula un al doilea bioreactor. Acest bioreactor de producție este umplut cu 4,5 L de mediu Cohen Wheeler suplimentat cu 1 g/l de extract de drojdii autolitice ultrafiltrat. Această cultură este incubată la 35°C, cu punctul oxigenului dizolvat stabilit la 26%, pH-ul inițial la 7,3 și incubarea stopată la aproximativ 20 de ore după inoculare. Suspensia de celule a fost concentrată prin 1) centrifugare volumului de cultură la aproximativ 21 000 g timp de aproximativ 30 de minute la +5°C și 2) resuspendarea peletele celulare într-un volum redus de aproximativ 14 al supernatantului de cultură.

2) Tratamentul termic al suspensiei concentrate de *B. pertussis*

Tratamentul termic al suspensiei de celule concentrate în supernatant de cultură a fost realizat într-o baie de apă care are un sistem de monitorizare a temperaturii care monitorizează setările parametrilor de temperatură astfel încât temperatura băii de apă a fost crescută treptat între 38°C și 50°C, timp de o perioadă de timp de 15 minute, urmată de o perioadă de timp de 30 de minute în care temperatura a fost menținută între 50°C și 54°C, și în final o perioadă de timp de 15 minute în care temperatura a fost scăzută treptat de la 50°C până la 38°C.

Viabilitatea suspensiei de celule concentrate a fost evaluată înainte și după tratamentul termic prin răspândirea a 0,5 mL de alicvot pe 3 cutii Petri conținând mediu solid Bordet-gengou (Merck; Ref

AX029167) suplimentat cu 25% de sânge de oaie (BioMerieux; Ref: 55822). Bacteriile au fost numărate după incubarea cutiilor Petri la 36,5°C timp de 5 zile (Tabelul 4).

Tabelul 4. Viabilitatea suspensiilor concentrate de *B. pertussis*, înainte și după tratamentul termic.

	Numărul de colonii (in UFC/ml)
suspensia de celule concentrată de 14 ori	$6,5 \times 10^{10}$
suspensia de celule tratată termic și concentrată de 14 ori	$1,4 \times 10^6$

5

Alte setări ale parametrilor temperaturii pentru perioadele de timp dedicate creșterii treptate și scăderii treptate a temperaturii între 38°C și 50°C, în special pentru perioadele de timp variind între 5 minute și 30 de minute au fost de asemenea evaluate. Aceste variații s-au dovedit a avea zero influență asupra procesului de inactivare.

10

3) Tratamentul hiperbaric al concentratului de *B. pertussis* tratat termic

Au fost testate diferite condiții de tratament hiperbaric: 2000 de bari timp de 30 de minute, 3000 de bari timp de 30 sau 90 de minute, 4000 de bari timp de 30 sau 90 de minute și 5000 de bari timp de 30 și 90 de minute. Unele condiții au fost repetate de mai multe ori.

15

Viabilitatea suspensiei de celule concentrate a fost controlată după tratamentul hiperbaric utilizând același protocol astfel cum este descris în paragraful anterior. Rezultatele sunt prezentate în Tabelul 5.

Tabelul 5. Viabilitatea reziduală a *B. pertussis* după diferite condiții de tratament hiperbaric.

Presiunea (in bari)	Timpul (in minute)	Viabilitatea reziduală
2000	30	+
3000	30	+/-
3000	90	-
4000	30	-
4000	90	-
5000	30	-
5000	90	-

+: activitatea bacteriană reziduală a fost observată cel puțin pe una din cele 3 cutii Petri utilizate pentru controlul creșterii celulare

20

+/-: activitatea bacteriană reziduală a fost uneori observată cel puțin pe una din cele 3 cutii Petri utilizate pentru controlul creșterii celulare, atunci când s-au repetat aceleași condiții hiperbarice

-: activitatea bacteriană reziduală nu a fost observată pe cele 3 cutii Petri utilizate pentru controlul creșterii celulare.

25

Aceste rezultate arată că concentratele tratate hiperbaric și termic au fost complet inactivate (fără activitatea bacteriană reziduală), atunci când s-a aplicat un tratament hiperbaric de 3000 de bari timp de mai mult de 30 de minute. Când s-a aplicat un tratament hiperbaric mai mare de 3000 de bari (de exemplu 4000 de bari sau 5000 de bari), o perioadă de timp de 30 de minute sau mai puțin a fost suficientă pentru a inactiva complet concentratele tratate hiperbaric și termic.

30

Concentratele tratate hiperbaric și termic care au fost complet inactivate au fost de asemenea testate într-un „test de restabilire”. Acest test a fost utilizat pentru a evalua dacă rezultatele inactivării a observate imediat după etapa de tratament hiperbaric au fost confirmate după o perioadă de repaus de 15 zile. Concentratele tratate hiperbaric și termic care au fost găsite inactivate au fost depozitate la temperatura camerei timp de 15 zile. 3 probe de 0,5 ml au fost apoi retrase din concentrate și însămânțate pe 3 cutii Petri conținând mediu solid Bordet-gengou suplimentat cu 25% de sânge de oaie. Cutiile Petri au fost incubate timp de 6 zile la 36,5°C și controlate pentru prezența coloniilor. Nu au fost detectate colonii, ceea ce înseamnă că nu a existat nici un fenomen de restabilire deoarece bacterii viabile nu au fost observate în concentratele complet inactivate testate, în special în concentratul tratat hiperbaric și termic care a fost supus la 4000 de bari timp de 90 de minute.

40

4) Caracterizarea concentratului de *B. pertussis* inactivat hiperbaric și termic

Caracteristicile biologice și analitice ale concentratului inactivat hiperbaric și termic, în special concentratul de celule supus la 4000 de bari timp de 90 de minute au fost comparate cu cele ale unui concentrat de *B. pertussis* inactivat cu mertiolat frecvent utilizat ca monovalent vrac pentru fabricarea vaccinului pertussis cu celule întregi. Concentratul de *B. pertussis* care a fost inactivat prin tratamentul cu mertiolat a fost preparat conform protocolului descris în paragraful 1).

45

4.1) Microscopia electronică de scanare

Caracteristicile morfologice ale concentratului inactivat hiperbaric și termic și concentratului inactivat cu mertiolat ca un martor au fost examinate prin microscopia electronică de scanare (MES). Concentratele de celule au fost fixate în 2,5% de glutaraldehidă în PBS, după care a urmat post-fixarea în 1% de soluție apoasă de tetroxid de osmiu. Materialele au fost apoi deshidratate în etanol și apoi în hexametildisilazan. Cele două probe au fost apoi așezate pe plăci de mică pentru observarea ulterioară prin MES (Hitachi S4700, 8KV) la diferite mărituri. Imaginile de microscopie electronică (mărire X30000) a concentratului inactivat hiperbaric și termic supus la 4000 de bari timp de 90 minute (partea dreaptă) și a concentratului inactivat cu mertiolat (partea stângă) sunt afișate în fig. ... Variații semnificative de morfologie nu au fost observate între cele două probe care au provenit din cele două procese de inactivare. În special, nu s-a observat liza bacteriană sau deformarea peretelui celular bacterian în proba care a provenit din concentratul inactivat hiperbaric și termic.

4.2) Eficacitatea concentratului inactivat hiperbaric și termic

Eficacitatea concentratului inactivat hiperbaric și termic supus la 4000 de bari timp de 90 de minute a fost evaluată prin determinarea dozei care a protejat 50% din șoareci (ED_{50}) împotriva efectelor unei doze letale de o tulpină de *Bordetella pertussis* administrată intracerebral. Această doză a fost comparată cu ED_{50} a unui vaccin Pertussis de referință calibrat în unități internaționale. Testul de eficacitate a fost efectuat în conformitate cu recomandările OMS menționate în TRS OMS nr. 941. Rezultatele obținute au fost satisfăcătoare, ceea ce înseamnă că asocierea tratamentului termic și tratamentelor hiperbarice nu scade eficacitatea preparatului inactivat.

4.3) Toxicitatea specifică

Concentratul inactivat hiperbaric și termic supus la 4000 de bari timp de 90 de minute a fost testat pentru toxicitate cu ajutorul testului de creștere în greutate pe șoareci în conformitate cu recomandările OMS menționate în TRS OMS nr. 941. Rezultatele obținute au fost satisfăcătoare, cu nici un semn de toxicitate.

4.4) Conținutul de endotoxină

Vaccinul pertussis cu celule integrale conține endotoxine de lipo-oligozaharide care sunt cuantificate prin analiza lizatului amebocitelor limulus. Conținutul de endotoxină în concentratul inactivat hiperbaric și termic a fost în același ordin de magnitudine al conținutului de endotoxină în concentratul de *B. pertussis* inactivat cu mertiolat.

EXEMPLUL 4: Solubilizarea proteinei KSAC exprimate în incluziuni virale *E. coli*

Incluziunile virale KSAC (a se vedea cererile provenite din USSN 61/694,968) au fost preparate în următoarele trei tampoane: 1) Tris 20 mM, 50 mM DTT, pH 8; 2) Tris 20 mM, 50 mM DTT, pH 8, uree 1M; 3) Tris 20 mM, 50 mM DTT, pH 8, uree 2M. Incluziunile virale KSAC preparate în aceleași tampoane la temperatura camerei fără presiune pe întreaga durată de tratament au fost utilizate ca martori.

Presurizarea la presiunea țintă a fost aplicată timp de 48 ore, iar apoi probele au fost depresurizate timp de 24 ore. FIG. 25 descrie SDS-PAGE a probelor KSAC tratate cu 3000 de bari. FIG. 26 descrie cromatograma CPLÎ suprapusă a supernatantului probelor KSAC tratate cu presiune de 3000 de bari și a proteinei KSAC obținute prin procedeul de repliere/solubilizare clasic. Rezultatele arată că vârfurile sunt similare și că proteina solubilă obținută prin tratamentul cu presiune ridicată este organizată în trimer.

Tabelul 6. Cuantificarea proteinei KSAC după tratamentul cu 3000 de bari prin qDot-blot și CLPÎ.

	2M uree		
	control	Precipitatul pentru analiză	Supernatantul pentru analiză
Dot-blot $\mu\text{g/ml}$	347	10	797
CLPÎ $\mu\text{g/ml}$	-	-	723
	1M uree		
	control	Precipitatul pentru analiză	Supernatantul pentru analiză
Dot-blot $\mu\text{g/ml}$	328	10	750
CLPÎ $\mu\text{g/ml}$	-	-	746
	Fără uree		
	control	Precipitatul pentru analiză	Supernatantul pentru analiză
Dot-blot $\mu\text{g/ml}$	123	15	649
CLPÎ $\mu\text{g/ml}$	-	-	825

Cantitatea de proteină solubilizată a fost de aproximativ 800 µg/mL, care a fost foarte aproape de cantitatea estimată de proteină KSAC inițială ca incluziuni virale (1000 µg/ml). Randamentul a fost astfel foarte mare (75-100%).

FIG. 27 prezintă suprapunerea datelor DLS obținute cu proteina presurizată la 3000 de bari (linia mai deschisă) în tamponul fără uree și proteina obținută prin procedeul de repliere/solubilizare clasic (linia mai închisă). Diapazonul exhaustiv al dimensiunilor (panoul de sus) arată că mai puține obiecte de dimensiuni mai mari sunt detectate în probele presurizate. Distribuția după număr (panoul de jos) arată că majoritatea populației repliată cu presiune are o dimensiune similară cu populația repliată prin procedeul clasic și plierea pare foarte asemănătoare.

FIG. 28 arată că dimensiunile proteinei obținute la 3000 de bari sunt identice cu dimensiunile proteinei obținute din cromatografia de repliere/solubilizare clasică pentru toate tampoanele utilizate acolo. Atunci când sunt tratate la 2000 de bari, dimensiunile proteinei sunt identice cu dimensiunile proteinei din cromatografia de repliere/solubilizare clasică când uree se utilizează în tampon. La presiune mai mare de 3000 de bari, agregatele de înaltă presiune apar atunci când nu se utilizează uree. Cu urea prezentă în tampon, proteina pare să se distrugă (10nm în dimensiune) ceea ce indică faptul că a avut loc o denaturare.

FIG. 29 prezintă compararea conținutului de proteină solubilă KSAC determinat prin CLPÎ și Qdot-blot. Rezultatele arată că concentrațiile maxime ale proteinei solubilizate sunt obținute cu probele tratate la 3000 de bari cu consistență bună între tehnologiile CLPÎ și Qdot-blot. Pentru probele tratate la 2000 de bari, prezența ureei ajută la creșterea randamentului de solubilizare. Pentru probele tratate la 4000 de bari, CLPÎ dă randament mai mare decât Qdot-blot, indicând o pierdere de recunoaștere a antigenilor.

EXEMPLUL 3: Compararea procedurii de solubilizare hiperbarică diferite - proteină KSAC

Obiectivul studiului este de a compara eficiența proteinei solubilizate din incluziuni virale prin diferite procedee.

Incluziunile virale KSAC produse din *E. coli* au fost preparate în următoarele tampoane pentru a forma o suspensie de incluziuni virale: a) 20 mM de tampon Tris, 50 mM de DiTioTreitol (DTT), pH=8,0; b) 20 mM de tampon Tris, pH=8,0.

Suspensiile de incluziuni virale au fost depozitate în tuburi Quick Seal pentru tratamente de înaltă presiune astfel cum este descris mai jos. În procedeul A, presurizarea treptată a fost aplicată la suspensiile de incluziuni virale crescând presiunea de la 0 bari până la 3000 de bari la 1000 bari/min, cu un platou de durată de 1 oră la fiecare 500 de bari (presiunea țintă de 3000 de bari atinsă după 5 ore). Presiunea de 3000 de bari a fost menținută timp de 48 de ore. Probele au fost apoi depresurizate de la 3000 de bari până la 0 bari la rata constantă de 125 bari/oră timp de 24 de ore. În procedeul B, suspensiile de incluziuni virale au fost tratate în conformitate cu metoda descrisă în US 6489450. Probele au fost supuse la presurizare la o rată constantă de până la 2500 de bari în 1 oră. Presiunea de 2500 de bari a fost menținută timp de 6 ore. Depresurizarea a fost realizată la rata constantă timp de 1 oră reducând presiunea de la 2500 de bari până la 0 bari. Probele au fost preparate astfel cum se arată în Tabelul 7 de mai jos.

Tabelul 7. Tratarea suspensiilor de incluziuni virale

Proba (1mg/mL de incluziuni virale KSAC)	Tamponul	Procedeul de tratare cu presiune înaltă
1	Tris 20mM	Procedeul A
2	Tris 20mM + DTT 50mM	Procedeul A
3	Tris 20mM	Control*
4	Tris 20mM + DTT 50mM	Control
5	Tris 20mM	Procedeul B
6	Tris 20mM + DTT 50mM	Procedeul B
7	Tris 20mM	Control
8	Tris 20mM + DTT 50mM	Control

Control *: nici un tratament cu presiune înaltă, păstrat la temperatura camerei.

Analiza SDS-PAGE

După tratamentele cu presiune înaltă, probele au fost centrifugate pentru a separa supernatantul și precipitatul și prelucrate pentru analiza proteinei pe SDS-PAGE. Analiza SDS-PAGE este prezentată în Figurile 18A și 18B. Fiecare godeu a fost încărcat cu câte 5 µl de probă (brută), 5 µl de supernatant, 5 µl de precipitat resuspendat în tampon Tris.

Cantitățile de proteine KSAC calculate din intensitatea benzilor pe SDS-PAGE au fost prezentate în Tabelul 8 de mai jos.

Tabelul 8. Integrarea comparativă a intensităților benzilor măsurate pe geluri SDS

proba		Procedeu A				Procedeu B			
		I.I. banda KSAC	Protein a totală I.I.	%KSAC /total	%KSAC-S /%KSAC-P*	I.I. banda KSAC	Protein a totală I.I.	%KSAC /total	%KSAC-S /%KSAC-P
referința KSAC		36	49	73%		29	47	62%	
Control – nici un DTT	S ¹	0	0	0%	-	0	0	0%	-
	P ²	13	26	50%		4	5	80%	
	C ³	3	21	14%		6	16	38%	
Procedeu – nici un DTT	S	0	9	0%	0%	0	2	0%	0%
	P	43	76	57%		28	39	72%	
	C	27	86	31%		14	41	34%	
Control – cu DTT	S	1	8	13%	-	0	0	0%	-
	P	20	40	50%		24	36	67%	
	C	16	31	52%		22	37	59%	
Procedeu – cu DTT	S	55	127	43%	75%	18	29	62%	69%
	P	8	14	57%		8	9	89%	
	C	45	106	42%		28	47	60%	
referința KSAC		38	52	73%		29	45	64%	

S¹: supernatantP²: precipitatC³: brută, înainte de centrifugare

5 % KSAC-S/% KSAC-P*: [% KSAC/total in supernatant] / [% KSAC/ total in precipitat]

10 Rezultatele arată că nu există o cantitate semnificativă de KSAC detectată în supernatantul controalelor sau probelor tratate cu procedeele A și B când a fost utilizată soluție-tampon care nu conține DTT. Proteina KSAC solubilă a fost găsită în supernatantul probelor tratate cu presiune ridicată (ambele procedee A și B), atunci când a fost utilizată soluție-tampon care conține DTT. Surprinzător, rezultatele cuantificării proteinei din SAS-PAGE indică de asemenea faptul că procedeu A a asigurat solubilizare mai bună în comparație cu procedeu B. Acest rezultat surprinzător a fost confirmat suplimentar prin calcularea mai precisă a randamentului de solubilizare pentru fiecare procedeu de înaltă presiune, utilizând Q-Dot Blot și CLPI.

Analiza Q-Dot Blot

15 Supernatanții din probe au fost analizați prin Q-Dot Blot pentru a estima cantitatea de proteine KSAC solubilizate prin tratamente. Rezultatele sunt prezentate în FIG. 30A-30D și Tabelul 11.

Tabelul 11. Concentrațiile KSAC solubilizate găsite în supernatanți pentru probele de control și probele prelucrate cu presiune înaltă

Identificarea	Procedeu A	Procedeu B
Tratament fără DTT	26,0 g/mL	12,7 g/mL
Proba de control fără DTT	0	9,9 g/mL
Tratament cu DTT	632,1 g/mL	368,9 g/mL
Proba de control fără DTT	61,7 g/mL	63,9 g/mL

20 Nici o diferență semnificativă nu a fost observată între probele de control (fără tratament cu presiune înaltă) cu și fără DTT. Nici o KSAC solubilă nu a fost găsită în supernatant. Rezultatul Q-Dot Blot a confirmat rezultatul SDS-PAGE.

25 Tratamentul realizat cu utilizarea procedurii A cu DTT a permis solubilizarea și replierea proteinei KSAC (detectate prin Q-Dot Blot). Concentrația proteinei KSAC solubile s-a dovedit a fi de 632 μg/mL cu utilizarea procedurii A în timp ce concentrația proteinei KSAC obținute cu utilizarea procedurii B a fost de numai aproximativ 369 g/mL. Randamentele solubilizării obținute sunt 63% pentru procedeu A și 37% pentru procedeu B. Rezultatele Q-Dot blot demonstrează suplimentar că procedeu A este mai eficient în producerea proteinelor solubile și repliate.

Analiza CLPI

30 Figura 20 prezintă suprapunerea cromatogramelor CLPI ale supernatantului probei de control și a probei tratate prin procedeu A. Timpul de retenție, volumul de retenție și puritatea estimată obținute pentru proba tratată prin procedeu A sunt prezentate în Tabelul 11 de mai jos.

Tabelul 11. Timpul de retenție, volumul de retenție și puritatea estimată obținute pentru proba tratată prin procedeu A

Deteția	Informația	Proba de control – nici o prelucrare	După procedeul A
UV	TR (Timpul de retenție – min)	12,7	12,4
	VR (Volumul de retenție – mL)	6,64	6,46
	Puritatea estimată (%)	17,3	85,5

Figura 21 prezintă suprapunerea cromatogramelor CLPÎ ale supernatantului probei tratate prin procedeul A și a probei tratate prin procedeul B. Timpul de retenție, volumul de retenție și puritatea estimată obținute pentru proba tratată prin procedeul A sunt prezentate în Tabelul 12 de mai jos.

5 Tabelul 12. Timpul de retenție, volumul de retenție și puritatea estimată obținute pentru probele tratate prin procedeul A și B

Deteția	Informația	Procedeul A	Procedeul B
UV	TR (Timpul de retenție – min)	12,4	12,4
	VR (Volumul de retenție – mL)	6,46	6,47
	Puritatea estimată (%)	85,5	74,2

10 Figura 22 arată suprapunerea cromatogramelor CLPÎ ale supernatantului probei tratate prin procedeul A, a probei tratate prin procedeul B și a probei tratate prin procedeul clasic (denaturarea și replierea obținute prin tratamentul cu uree și DTT). Timpul de retenție, volumul de retenție și puritatea estimată obținute pentru probele tratate prin procedeul A sunt prezentate în Tabelul 13 de mai jos.

Tabelul 13. Timpul de retenție, volumul de retenție și puritatea estimată obținute pentru probele tratate prin procedeul A, procedeul B și procedeul clasic

Deteția	Informația	Procedeul clasic	Procedeul A	Procedeul B
UV	TR (Timpul de retenție – min)	12,5	12,4	12,4
	VR (Volumul de retenție – mL)	6,50	6,46	6,47
	Aria picului (mAU)	8628	25251	10506
	Puritatea estimată (%)	94,7	85,5	74,2

15 Rezultatele CLPÎ au confirmat, de asemenea, că prin procedeul A s-a asigurat o mai bună solubilizare a proteinei KSAC decat procedeul B, judecând din ariile picurilor (25251 mAU pentru procedeul A în raport cu 10,506 mAU pentru procedeul B). Atât procedeul A, cât și procedeul B permite obținerea unei replieri a

20 proteinei KSAC foarte apropiate de cea obținută cu utilizarea procedeeului clasic (solubilizarea utilizând tratamentul cu uree + DTT și replierea prin cromatografie SEC). Experimentele efectuate cu ambele

25 procedee A și B nu a produs proteină KSAC solubilă semnificativă în absența DTT. Rezultatele au confirmat faptul că este necesar un agent de reducere în timpul tratamentului cu presiune înaltă pentru a rupe legăturile disulfurice. Cu toate acestea, descoperirea surprinzătoare neașteptată este faptul că nu este necesară îndepărtarea DTT pentru a obține o repliere corectă a proteinei. Contrar cunoștințelor generale că DTT trebuie să fie îndepărtat din soluția-tampon pentru ca proteinele să fie repliate în mod corespunzător, solicitanții au descoperit în mod surprinzător că prezența DTT nu interferează cu procesul de repliere în tratamentul cu presiune înaltă al prezentei invenții. Proteinele KSAC solubile obținute din procesul cu presiune înaltă al prezentei invenții s-au repliat corect pentru a forma trimere în prezența DTT.

(56) Referințe bibliografice citate în descriere:

1. C. SILVA ET AL., "Effect of hydrostatic pressure on the *Leptospira interrogans*: high immunogenicity of the pressure-inactivated serovar hardjo", VACCINE, (2001), vol. 19, pages 1511 - 1514,
2. M. RITZ ET AL., "Effects of high hydrostatic pressure on membrane proteins of *Salmonella typhimurium*", INTERNATIONAL JOURNAL OF FOOD MICROBIOLOGY, (2000), vol. 55, pages 115 - 119,
3. ISBAM S. ET AL., "Inactivation of avian influenza virus by heat and high hydrostatic pressure", JOURNAL OF FOOD PROTECTION, (2007), vol. 70, pages 667 - 673
4. N. WILKINSON ET AL., "Resistance of poliovirus to inactivation by high hydrostatic pressures", INNOVATIVE FOOD SCIENCE AND EMERGING TECHNOLOGIES, (2001), vol. 2, pages 95 - 98
5. SHEARER; KNIEL, "High Hydrostatic Pressure for Development of Vaccines", JOURNAL OF FOOD PROTECTION, (2009), vol. 72, no. 7, pages 1500 - 1508
6. US 2008161242 A1 2008.07.03

(57) Revendicări:

1. Dispozitiv hiperbaric pentru inactivarea microorganismelor sau pentru replierea și solubilizarea proteinelor, care conține:

- manta;
- cel puțin un procesor de calculator și o interfață de utilizator programabilă pentru acesta;
- un mijloc de admisiune a presiunii super-ambiante;
- un mijloc de control al temperaturii și presiunii a unui fluid care transmite presiune;
- un mijloc de decontaminare a dispozitivului pentru scopurile de curățare de rutină sau în caz de

rupere a unei pungi pentru probe; și

- un mijloc de recepție în dispozitiv, de transport în interiorul dispozitivului, precum și de evacuare din dispozitiv, a cuvelor sau containerelor care sunt adaptate pentru a recepționa pungile pentru probe conținând fie microorganisme care urmează să fie inactivate sau peptide care urmează să fie solubilizate și repliate.

2. Dispozitiv, conform revendicării 1, caracterizat prin aceea că mijlocul de presiune conține o presă izostatică care conține un piston.

3. Dispozitiv, conform revendicării 2, caracterizat prin aceea că cuprinde suplimentar un mijloc de monitorizare a stării de inactivare a microorganismelor.

4. Dispozitiv, conform revendicării 3, caracterizat prin aceea că mijlocul de monitorizare a inactivării conține un ac sau o altă sondă potrivită, care poate penetra în mod aseptice pungile pentru a elimina proba de microorganisme pentru testarea ulterioară a viabilității.

5. Dispozitiv, conform oricăreia dintre revendicările 1-4, care conține:

- o cameră de fluid primar (8);
- o cameră amplificatoare de presiune (9), care primește aer/fluid de înaltă presiune dintr-un dispozitiv amplificator de presiune;
- o cameră de fluid de înaltă presiune (3), care este configurată pentru a primi fluid prin intermediul orificiului de intrare (2);
- un plunger/piston de refulare (5), care este capabil să se deplaseze între poziția extinsă și poziția retrasă;

- o garnitură de etanșare (6) și o placă de obturare (7), care sunt configurate pentru a preveni scurgerea fluidului din camera de fluid de înaltă presiune (3) când plungerul de refulare (5) se deplasează din poziția retrasă în poziția extinsă;

în care presiunea este comunicată de la un dispozitiv amplificator de presiune la camera amplificatoare de presiune (9) și de la camera amplificatoare de presiune (9) la camera de fluid primar (8);

în care presiunea din camera de fluid primar (8) este comunicată camerei de fluid de înaltă presiune (3) prin deplasarea plungerului de refulare (5) din poziția retrasă în poziția extinsă; și

în care după terminarea ciclului (ciclurilor) de presurizare și depresurizare, lichidul este evacuat prin orificiul de evacuare (4).

6. Dispozitiv, conform revendicării 5, în care fluidul intră în camera de fluid de înaltă presiune (3) prin intermediul orificiului de intrare (2) în timp ce plungerul/pistonul de refulare (5) este retras.

7. Dispozitiv, conform revendicării 6, în care pistonul (5) blochează orificiul de intrare pentru fluid (2) în timp ce acesta începe să se extindă și

în care în timpul ciclului de presurizare, atunci când pistonul (5) se deplasează de la poziția retrasă la poziția sa extinsă, sigiliul (6) previne scurgerea fluidului din camera de fluid de înaltă presiune (3) prin intrarea (2); și

în care placă de obturare (7) previne scurgerea fluidului din camera de presiune ridicată prin orificiul de evacuare (4).

8. Metodă pentru inactivarea hiperbarică a microorganismelor, pentru scopul preparării microorganismelor pentru utilizare în calitate de componente ale unei compoziții de vaccin, care cuprinde etapele de:

- supunere a microorganismelor la presiune ridicată pentru perioade determinate de timp;
- determinare a faptului că microorganismele sunt 100% inactivate; inactivând astfel microorganismele; și

în care metoda este realizată utilizând dispozitivul definit în revendicarea 5.

9. Metodă pentru inactivarea hiperbarică a unei suspensii de celule de *Bordetella pertussis* care cuprinde etapele de:

- producere a unei suspensii de celule *Bordetella pertussis* într-un mediu de cultură,
- concentrare a suspensiei de celule produse în mediul de cultură menționat, opțional suplimentat cu ser fiziologic (0,9% NaCl) sau o soluție-tampon care nu depășește 25% din volumul final (V/V),
- încălzire a suspensiei de celule concentrate la o temperatură cuprinsă între 50°C și 54°C (limitele incluse), și
- inactivare a suspensiei de celule concentrate și tratate termic prin tratamentul cu presiune înaltă în care presiunea este mai mare de 2000 de bari, dar mai mică de 6000 de bari; și

în care metoda este realizată utilizând dispozitivul definit în revendicarea 5.

10. Metodă, conform revendicării 9, caracterizată prin aceea că mediul de cultură este mediul Cohen Wheeler.

11. Metodă, conform revendicării 9 sau 10, în care încălzirea la o temperatură cuprinsă între 50°C și 54°C (limitele incluse) durează 30 de min.

12. Metodă, conform oricăreia dintre revendicările 9-11, în care presiunea este cuprinsă între 3000 de bari și 5000 de bari.

13. Procedeu de fabricare a unui vaccin *Pertussis* cu celule integrale care cuprinde etapele de:

- inactivarea unei suspensii de celule concentrate de *Bordetella pertussis*, utilizand metoda din oricare dintre revendicările 9-12,
- diluare a suspensiei de celule concentrate inactivate de *B. pertussis* într-un excipient acceptabil farmaceutic.

14. Metodă, conform revendicării 8, în care microorganismele sunt supuse la mai mult de un ciclu de presiune ridicată.

15. Metodă, conform revendicării 8, care cuprinde suplimentar etapa de monitorizare a stării de inactivare a microorganismelor ca o funcție de timp printr-un mijloc automat de testare a viabilității.

16. Metodă, conform revendicării 14, caracterizată prin aceea că cuprinde suplimentar etapa de evaluare a imunogenității microorganismelor inactivate.

17. Metodă, conform revendicării 16, caracterizată prin aceea că evaluarea este realizată utilizând analiza ELISA specifică pentru antigenii cunoscuți sau presupusă ca fiind responsabilă pentru provocarea unui răspuns imun protectiv la un animal țintă.

18. Agent patogen inactivat hiperbaric produs cu utilizarea dispozitivului, definit în revendicarea 5.

19. Agent patogen, conform revendicării 18, care este din genul *Leptospira*.

20. Agent patogen, conform revendicării 18, care este *Erysipelothrix rhusiopathiae*.

21. Agent patogen inactivat hiperbaric produs cu utilizarea metodei, definite în revendicarea 14.

22. Agent patogen, conform revendicării 21, care este din genul *Leptospira*.

23. Agent patogen, conform revendicării 21, care este *Erysipelothrix rhusiopathiae*.

24. Compoziție imunogenă care conține agent patogen inactivat, definit în revendicarea 18 sau revendicarea 21.

25. Compoziție, conform revendicării 24, care este o compoziție de vaccin, capabilă să provoace la un animal un răspuns imun protectiv împotriva unei forme vii, virulente din agentul patogen inactivat.

26. Compoziție, conform revendicării 24, care conține suplimentar un vehicul sau purtător acceptabil farmaceutic sau veterinar, și opțional un adjuvant.

27. Metodă de fabricare a unei compoziții de vaccin care cuprinde etapa de amestecare a agentului patogen conform revendicării 24 cu un vehicul sau purtător adecvat, și opțional un adjuvant, fabricând astfel compoziția de vaccin.

28. Metodă, conform revendicării 27, caracterizată prin aceea că adjuvantul este un adjuvant la membrana mucoasă.

29. Compoziție care conține o proteină repliată cu dispozitivul hiperbaric definit în revendicarea 5.
30. Compoziție, conform revendicării 29, caracterizată prin aceea că proteina a fost supusă la presiune înaltă de la aproximativ 1000 de bari până la aproximativ 5000 de bari.
31. Compoziție, conform revendicării 30, caracterizată prin aceea că presiunea înaltă a fost aplicată timp de cel puțin 20 de ore.
32. Compoziție, conform revendicării 30, caracterizată prin aceea că proteina a fost solubilizată sau repliată din incluziuni virale de *E. coli*.
33. Compoziție, conform revendicării 32, caracterizată prin aceea că incluziunile virale de *E. coli* au fost preparate într-o soluție-tampon care nu conține sau conține uree scăzută.
34. Compoziție, conform revendicării 32, caracterizată prin aceea că incluziunile virale de *E. coli* au fost preparate într-o soluție-tampon care conține DTT.
35. Compoziție, conform revendicării 33 sau 34, caracterizată prin aceea că incluziunile virale de *E. coli* au fost supuse în continuare la o presiune înaltă în limitele de la aproximativ 1000 de bari până la aproximativ 5000 de bari.
36. Compoziție, conform revendicării 32, caracterizată prin aceea că incluziunile virale de *E. coli* au fost tratate sub presiune înaltă timp de aproximativ 20 de ore până la aproximativ 100 de ore.
37. Compoziție, conform revendicării 32, caracterizată prin aceea că incluziunile virale de *E. coli* au fost depresurizate la aproximativ 83 bar/min...125 bar/min.
38. Metodă de producere a unei proteine solubile exprimate în procariote sau eucariote care cuprinde etapele de:
- preparare a incluziunilor virale de *E. coli* într-o soluție-tampon care nu conține sau conține concentrație scăzută de uree pentru a forma o suspensie de incluziuni virale; și
 - supunere a suspensiei de incluziuni virale la o presiune înaltă, producând astfel proteina solubilă; și
- în care metoda este realizată utilizând dispozitivul definit în revendicarea 5.
39. Metodă de producere a unei proteine solubile exprimate în procariote sau eucariote care cuprinde etapele de:
- preparare a incluziunilor virale într-o soluție-tampon care nu conține sau conține concentrație scăzută de uree pentru a forma o suspensie de incluziuni virale;
 - supunere a suspensiei de incluziuni virale la o creștere treptată a presiunii pentru o perioadă de timp; și
 - menținere a presiunii înalte aplicate la incluziunile virale pentru o perioadă de timp, producând astfel proteina solubilă; și
- în care metoda este realizată utilizând dispozitivul definit în revendicarea 5.
40. Metodă, conform revendicării 38 sau 39, caracterizată prin aceea că soluția-tampon conține suplimentar DTT.
41. Metodă, conform revendicării 38 sau 39, caracterizată prin aceea că presiunea înaltă este în limitele de la aproximativ 2000 de bari până la aproximativ 5000 de bari.
42. Metodă, conform revendicării 38 sau 39, caracterizată prin aceea că incluziunile virale sunt supuse la presiunea înaltă timp de aproximativ 20 de ore până la aproximativ 100 de ore.
43. Metodă, conform revendicării 38, caracterizată prin aceea că concentrația DTT este de la aproximativ 1 mM până la aproximativ 100 mM.
44. Metodă, conform revendicării 38 sau 39, caracterizată prin aceea că concentrația ureei este de la 0 M până la aproximativ 7 M.
45. Metodă, conform revendicării 38 sau 39, caracterizată prin aceea că metoda cuprinde suplimentar etapa de depresurizare.

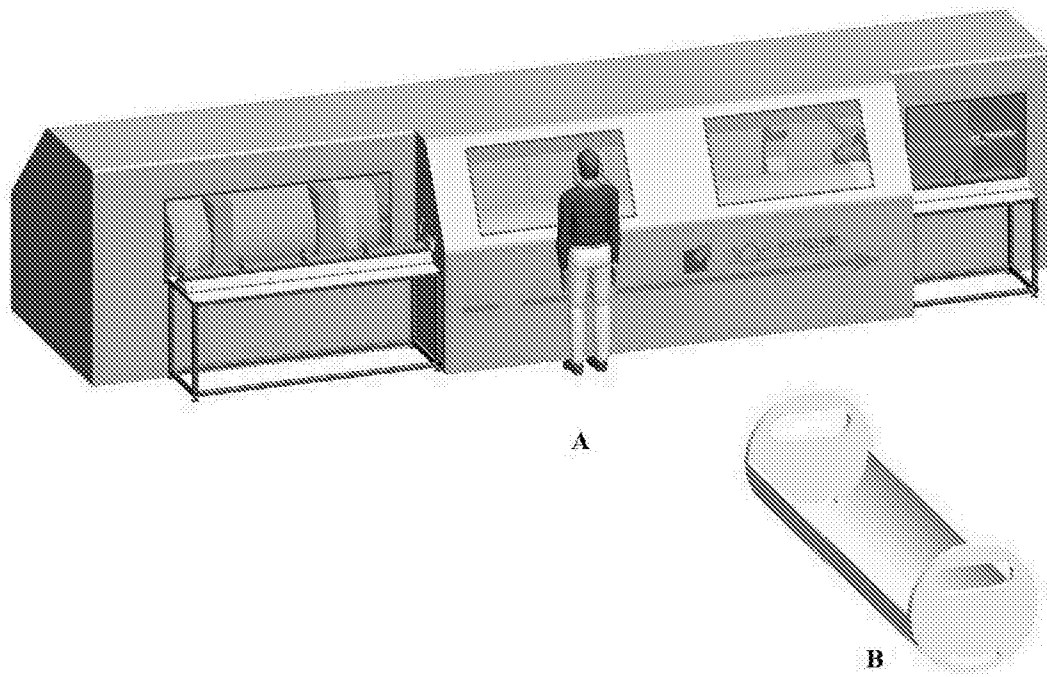


Fig. 1

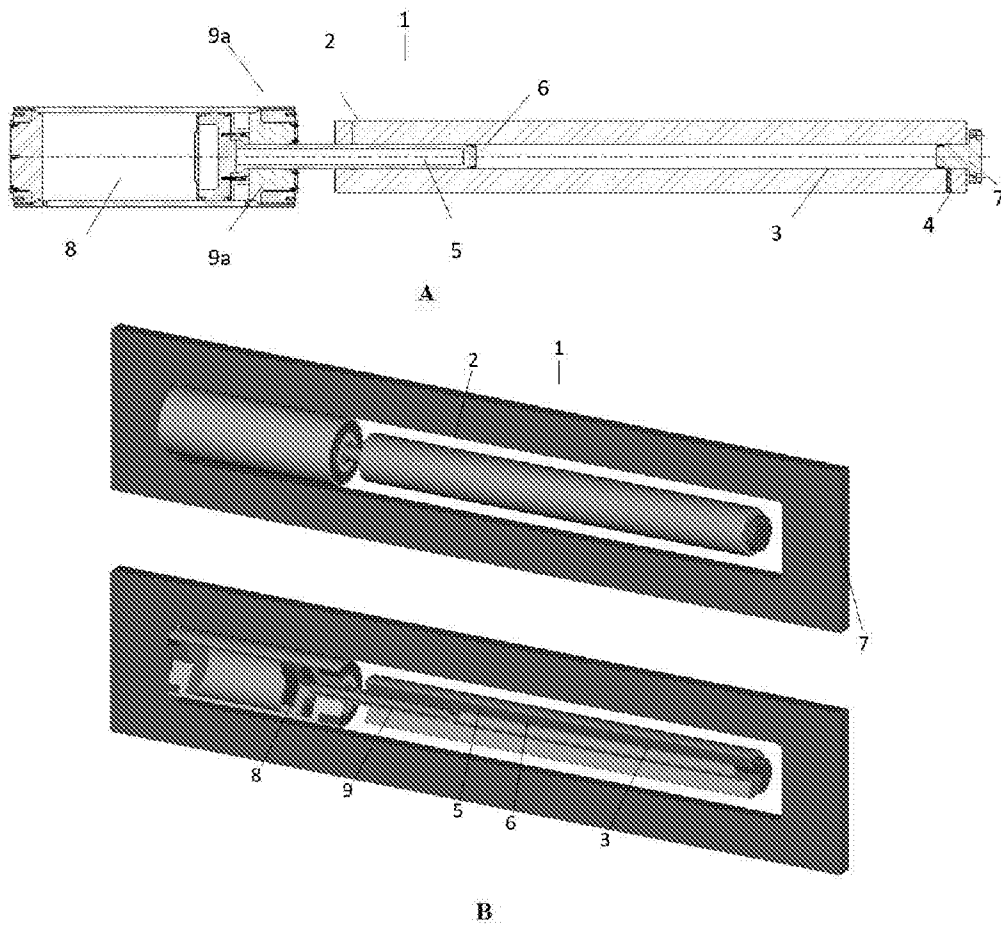


Fig. 2

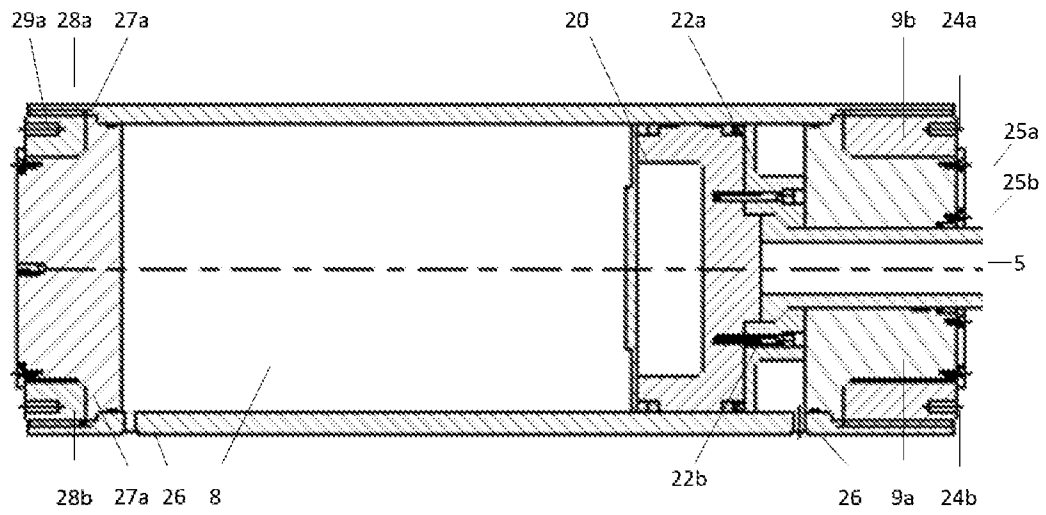


Fig. 3

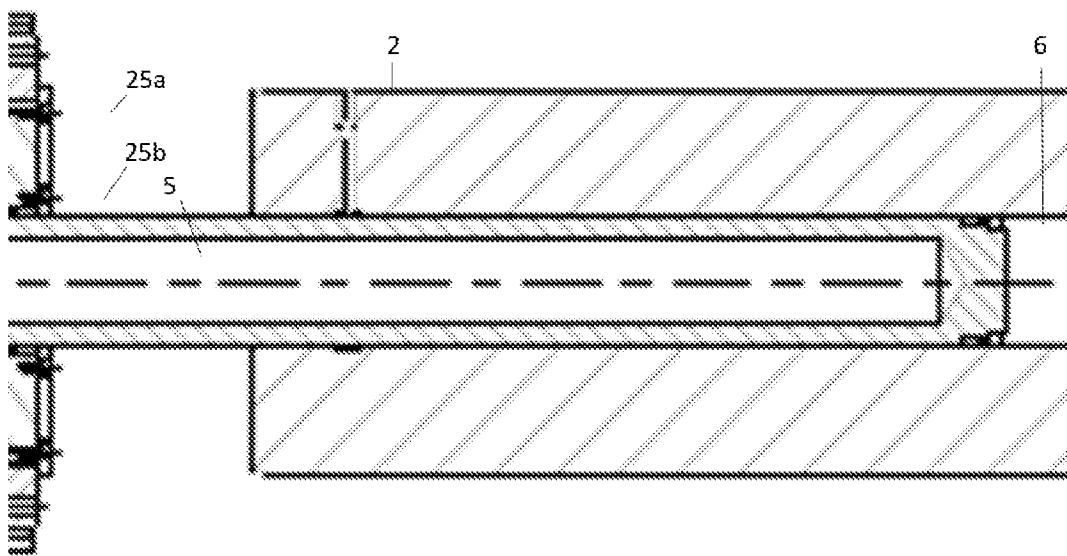


Fig. 4

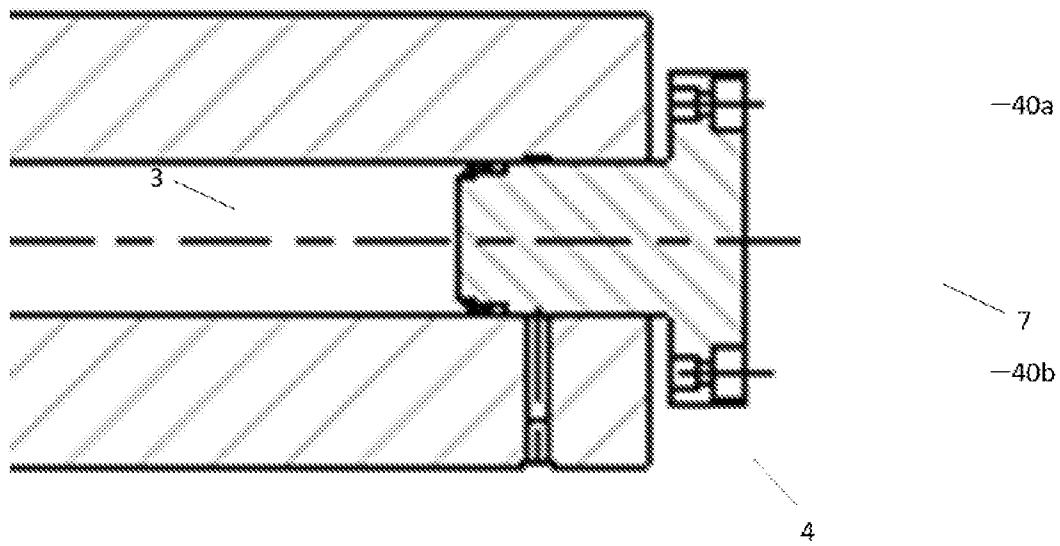


Fig. 5

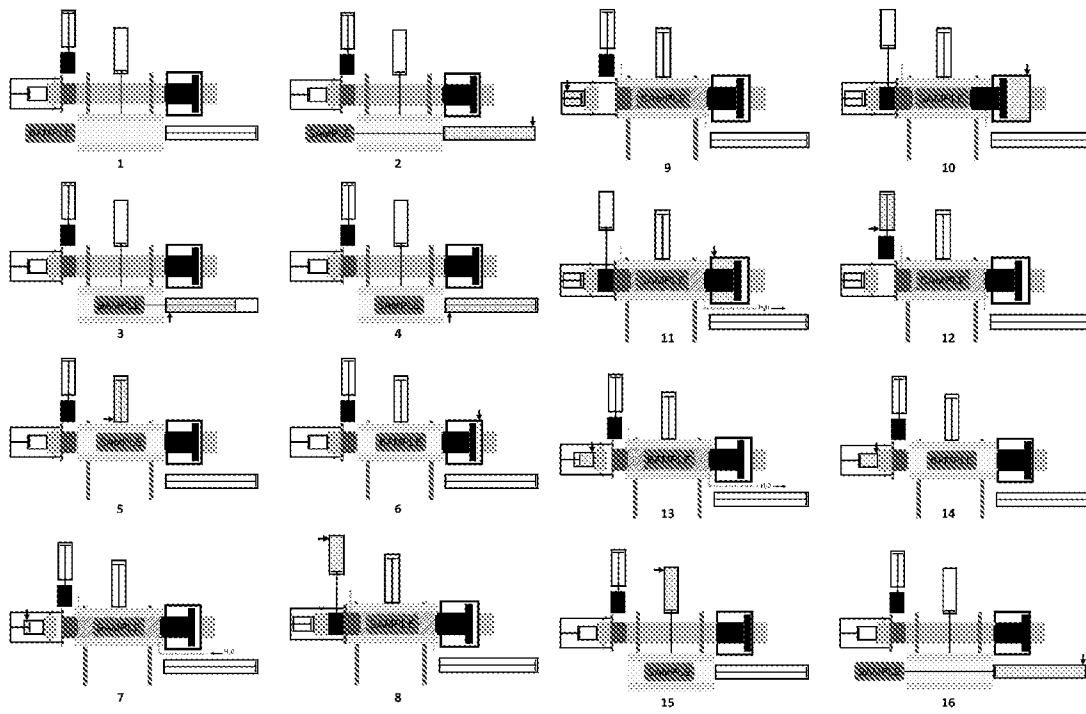


Fig. 6

Procedura de funcționare sigură a dispozitivului hiperbaric

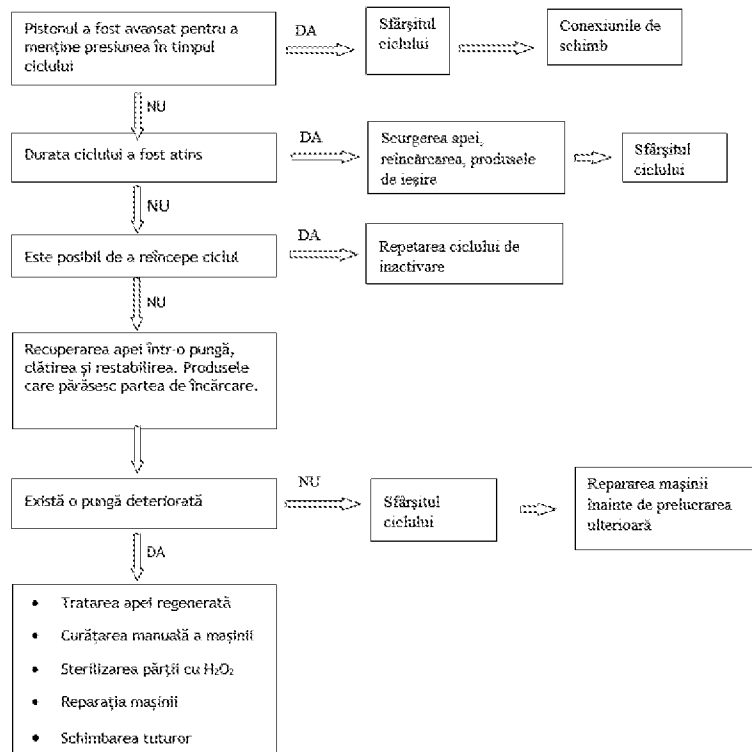


Fig. 7

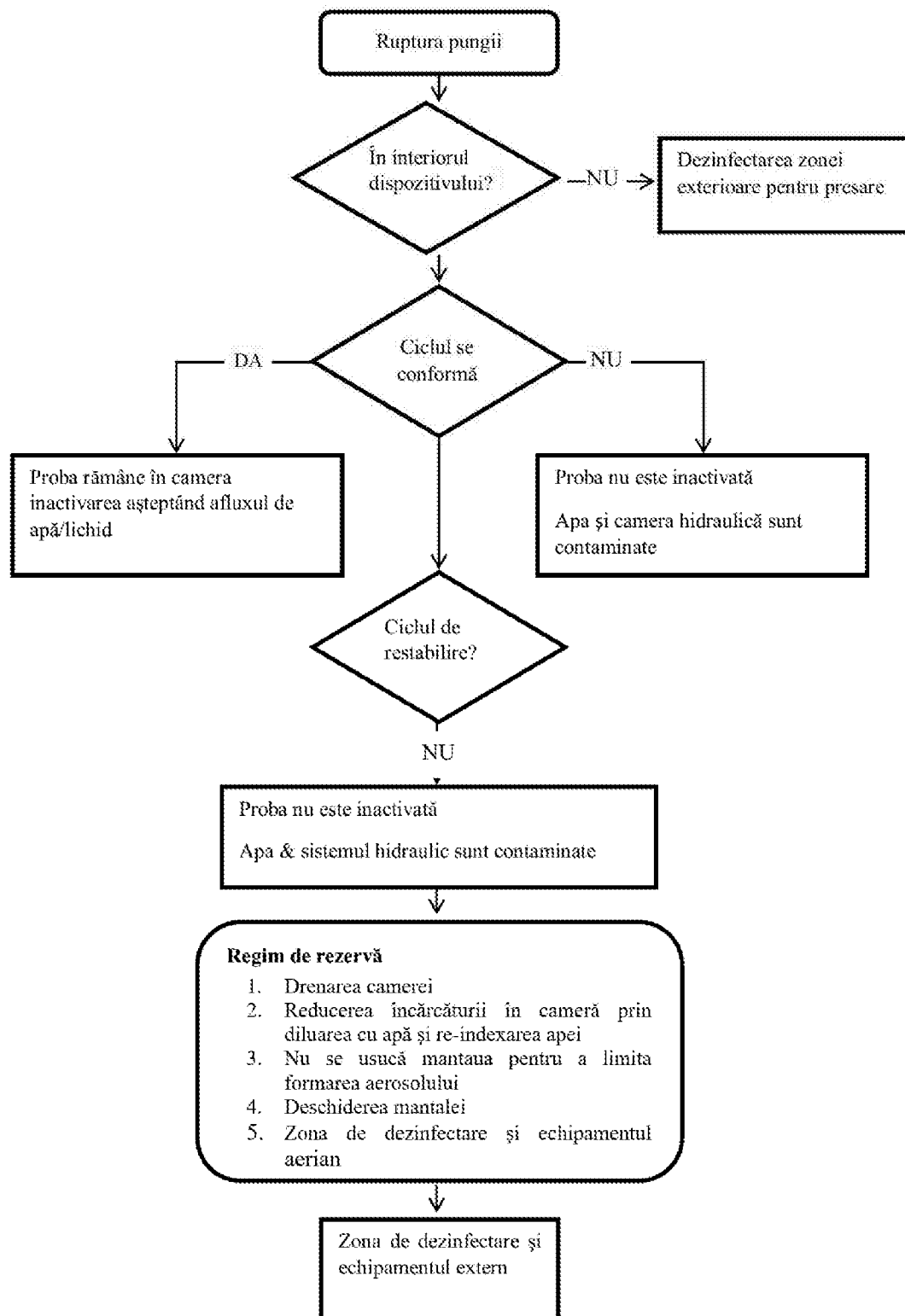


Fig. 8

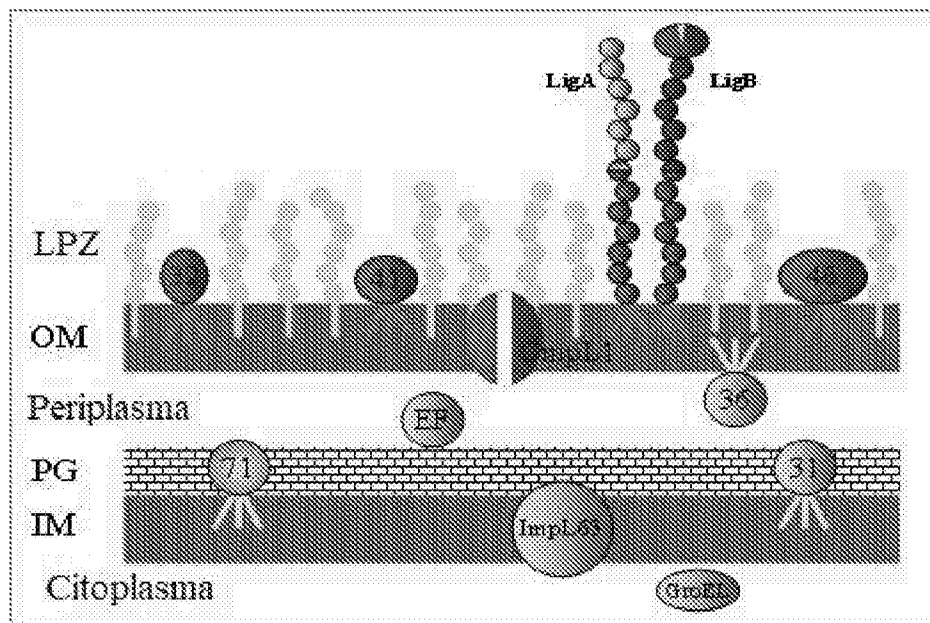


Fig. 9

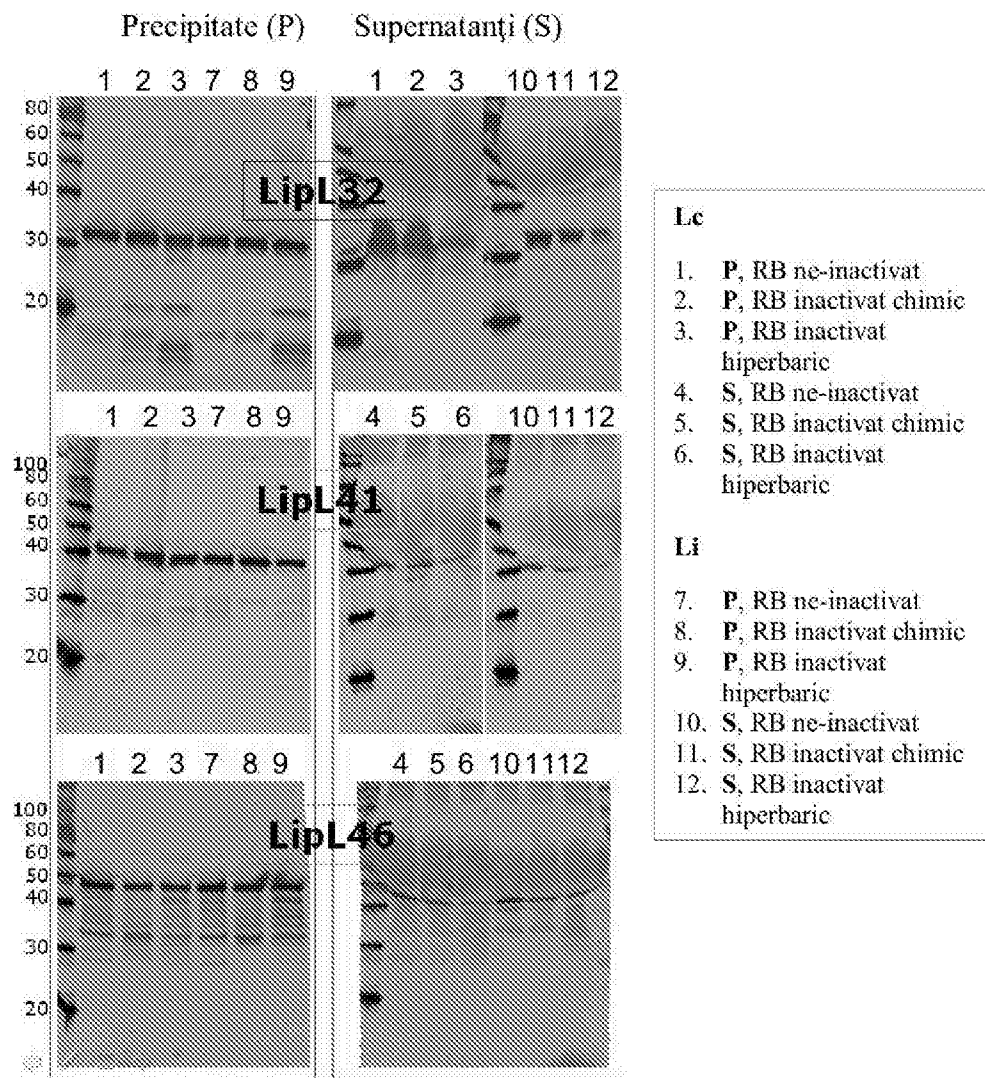


Fig. 10

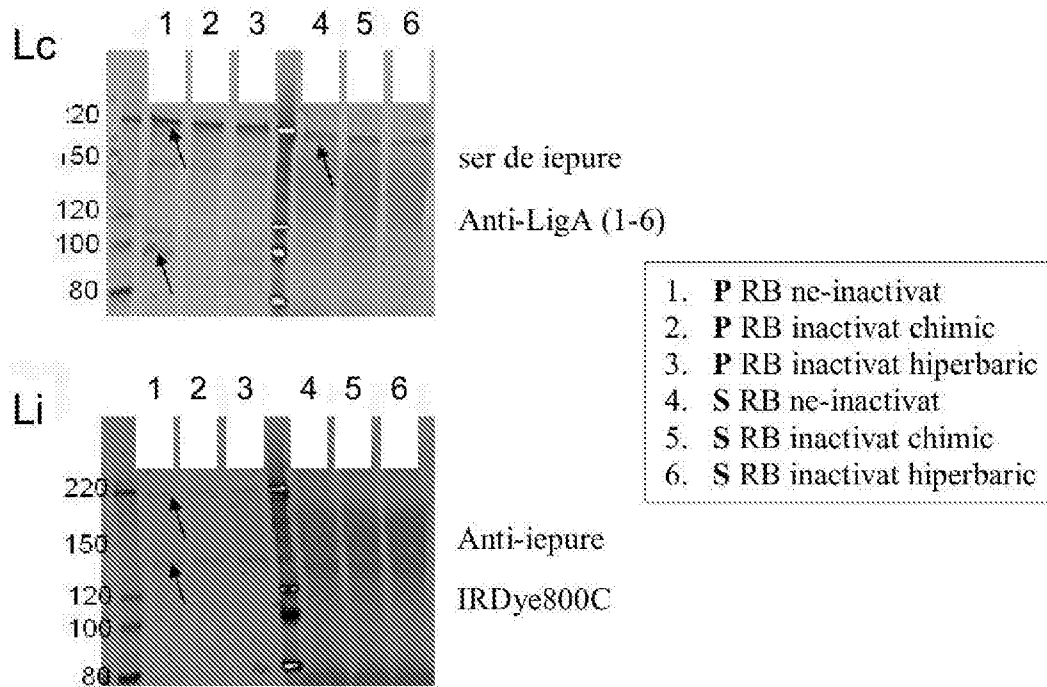


Fig. 11

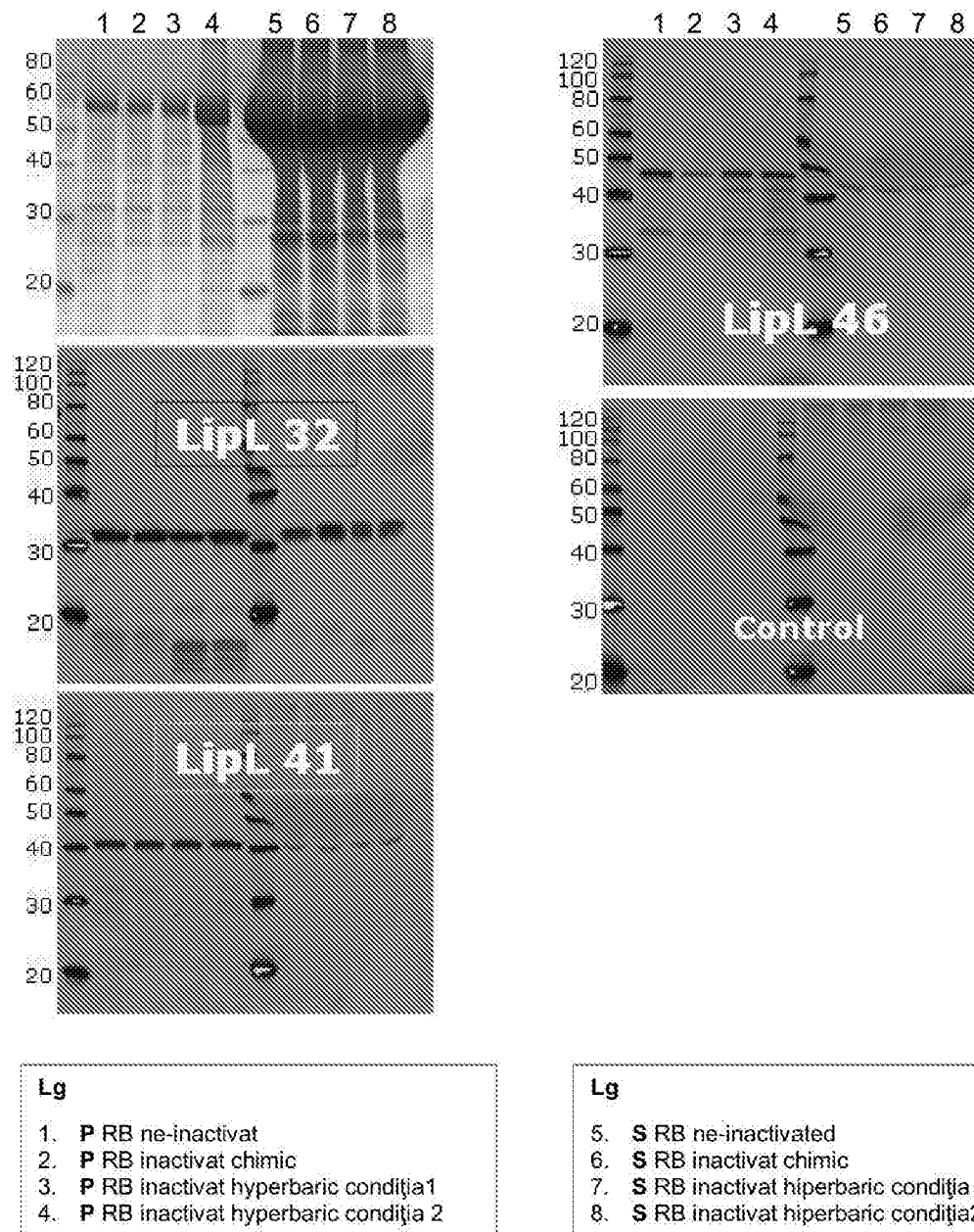
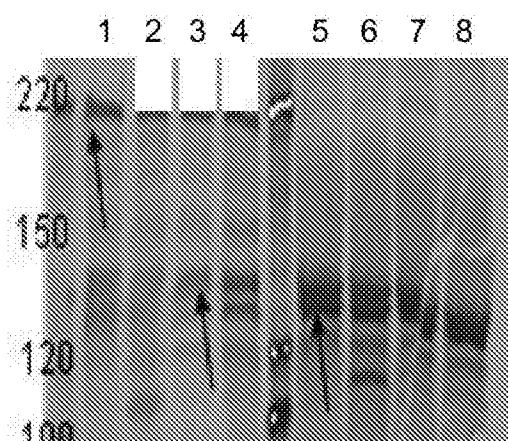


Fig. 12



Lg

1. **P** RB ne-inactivat
2. **P** RB inactivat chimic
3. **P** RB inactivat hyperbaric condiția 1
4. **P** RB inactivat hyperbaric condiția 2
5. **S** RB ne-inactivat
6. **S** RB inactivat chimic
7. **P** RB inactivat hyperbaric condiția 1
8. **P** RB inactivat hyperbaric condiția 2

Fig. 13

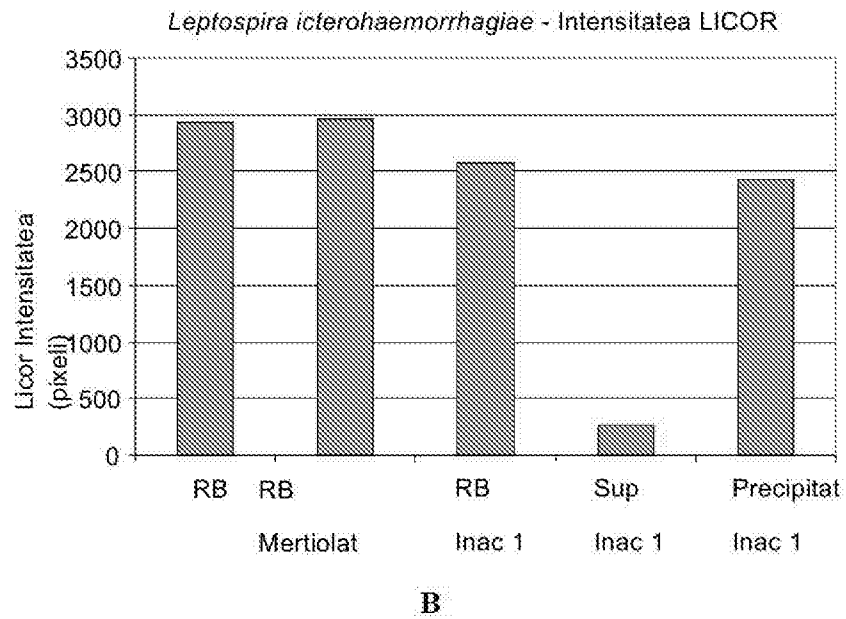
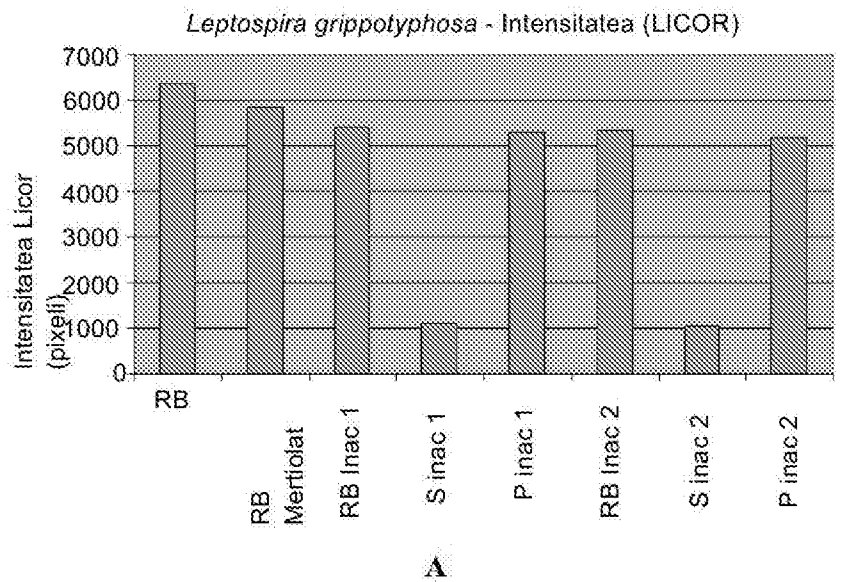


Fig. 14

Titrul ($\log_{10}/\text{ml}$) după tratamentul de 60 min la
diferite temperaturi și presiuni

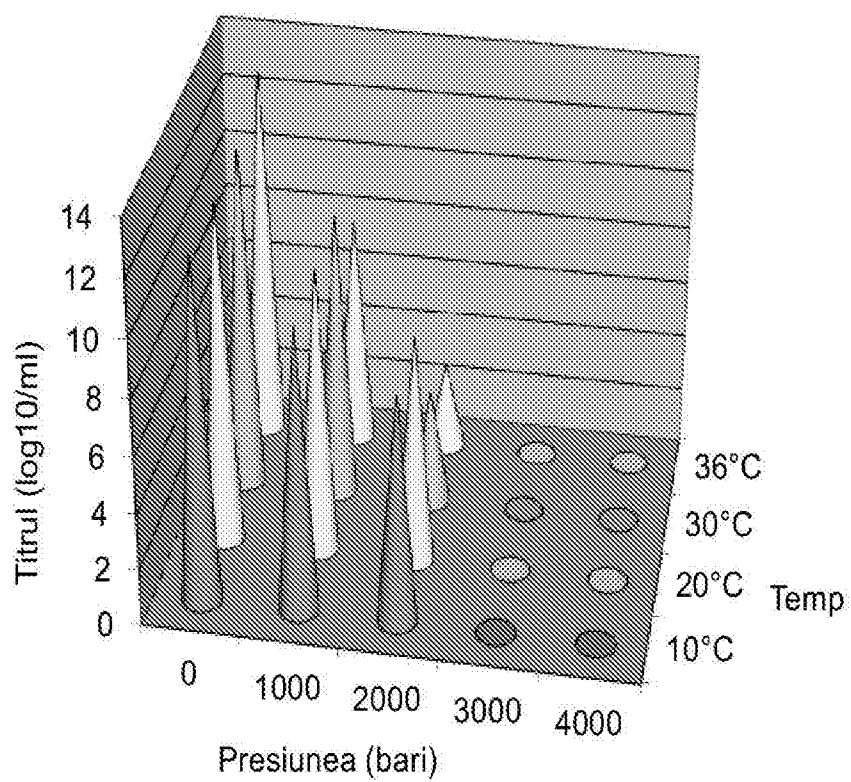


Fig. 15

Supunerea bacteriilor la condiții specifice pentru a preveni „fenomenul de restabilire”

Condițiile de inactivare	Condițiile de incubare	Inactivarea după a 11-a zi de incubare
60 min. 3500 bar 37°C	+5°C	+
	Ambiantă	+
	37°C	+
30 min. 4000 bar 37°C	+5°C	-
	Ambiantă	+
	37°C	-
90 min. 4000 bar 37°C	+5°C	-
	Ambiantă	-
	37°C	-

Condițiile de inactivare	Durata stabilității inactivării	Condițiile de incubare	Controlul inactivării
90 min. 4000 bari 37°C 20X	D0	37°C	-
	Absența restabilirii (D5, D10, D17, D21)	+5°C	-
		Ambiantă	-
		37°C	-

Fig. 16

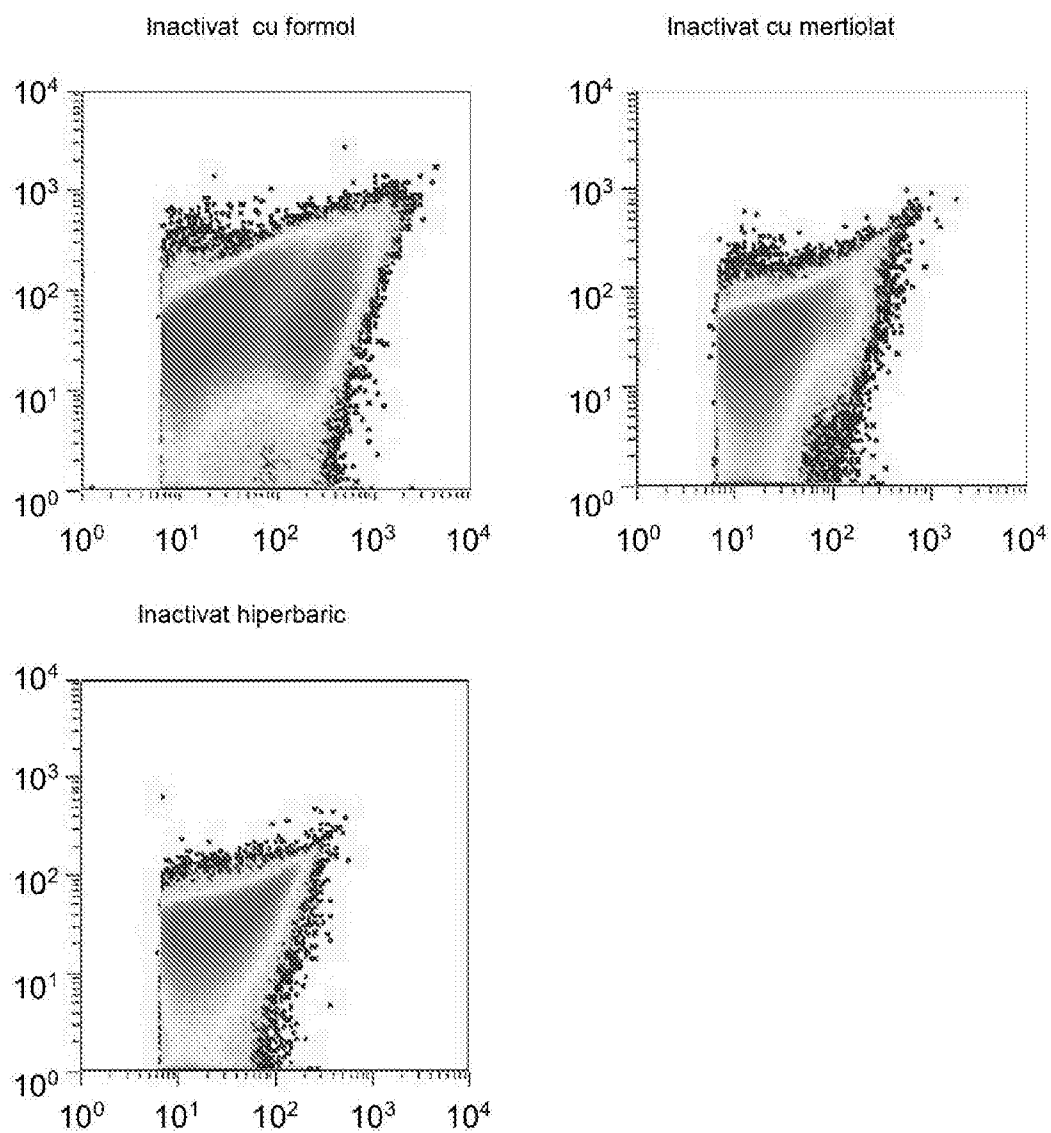
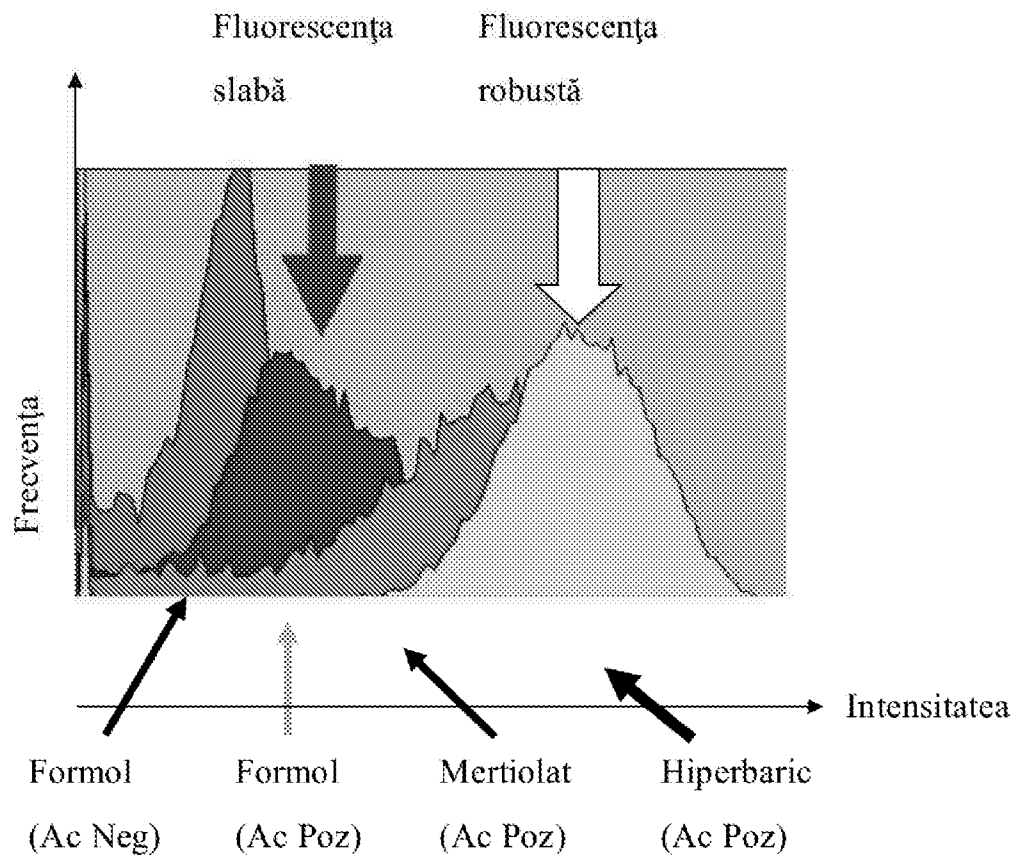


Fig. 17



% Intensități medii marcate

Formol	56	2
Mertiolat	79	7
Hiperbaric	95	24

Fig. 18

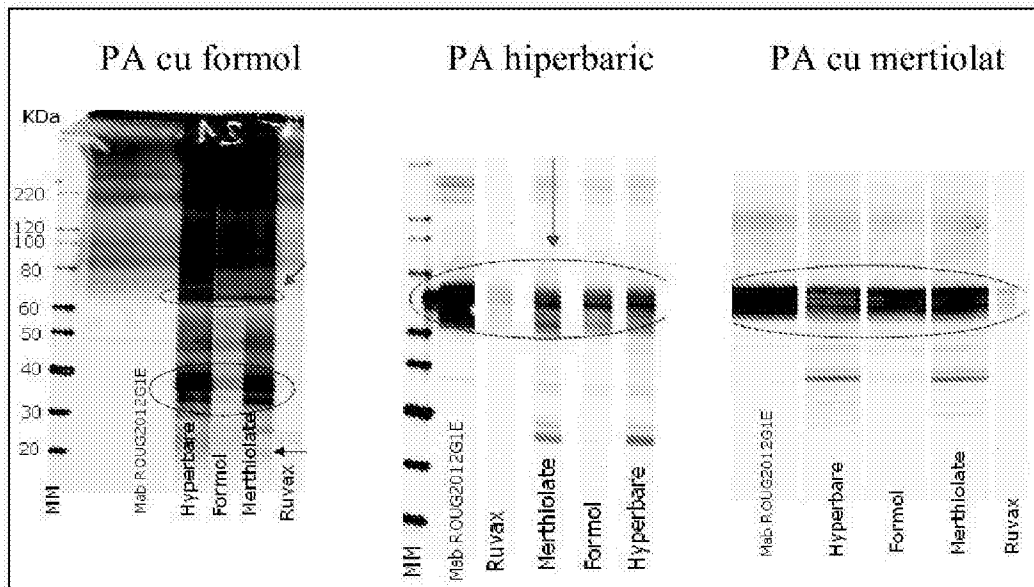


Fig. 19

Grupul	Nr. de șoareci	Vaccinul	Diluția	Rata de protecție	Titrul ELISA
1	20	Inactivat hiperbaric	1/25	100%	3.35
2	20		1/50	90%	3.30
3	20		1/100	50%	3.09
4	20	Inactivat cu formol	1/25	90%	3.42
5	20		1/50	90%	3.19
6	20		1/100	20%	2.76
7	20	Inactivat cu mertiolat	1/25	90%	3.49
8	20		1/50	90%	3.10
9	20		1/100	60%	2.81
10	10	<i>Nevaccinat</i>	-	0%	-

Fig. 20

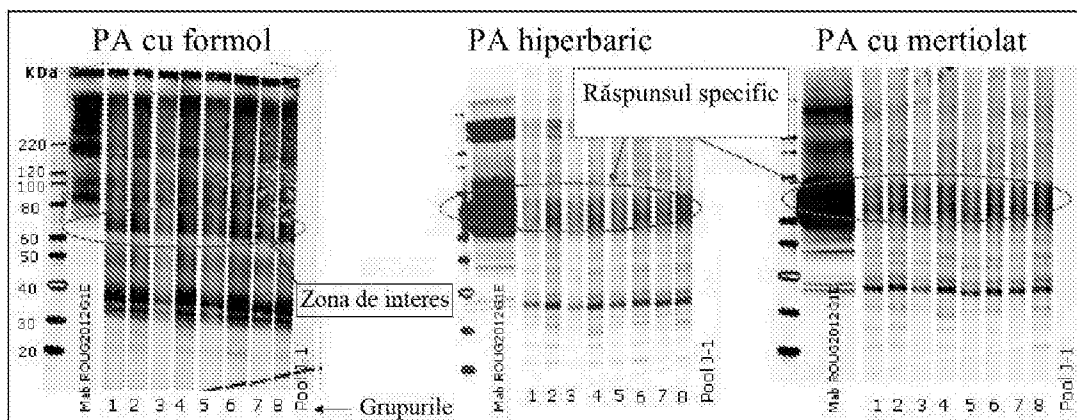


Fig. 21

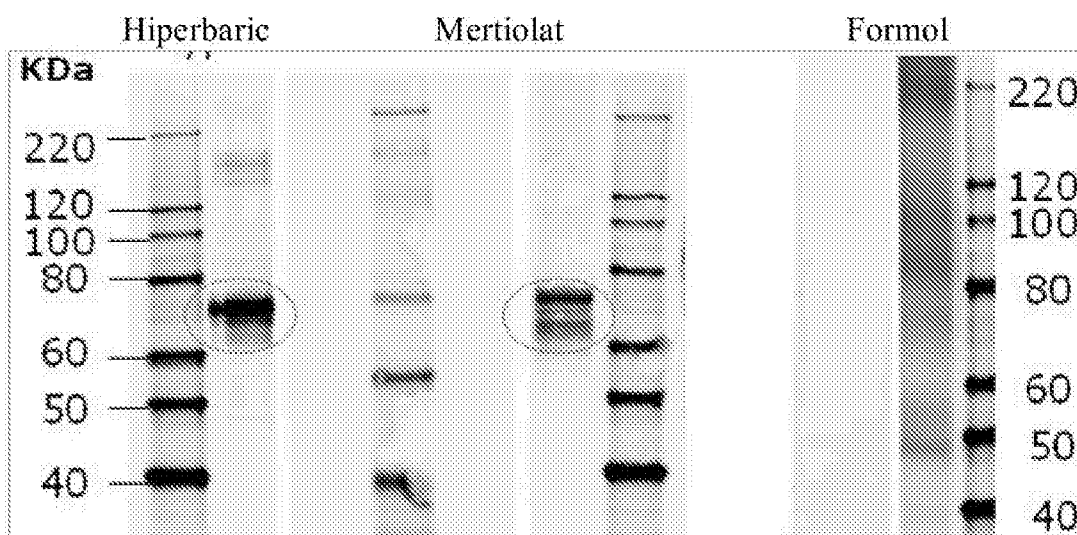


Fig. 22

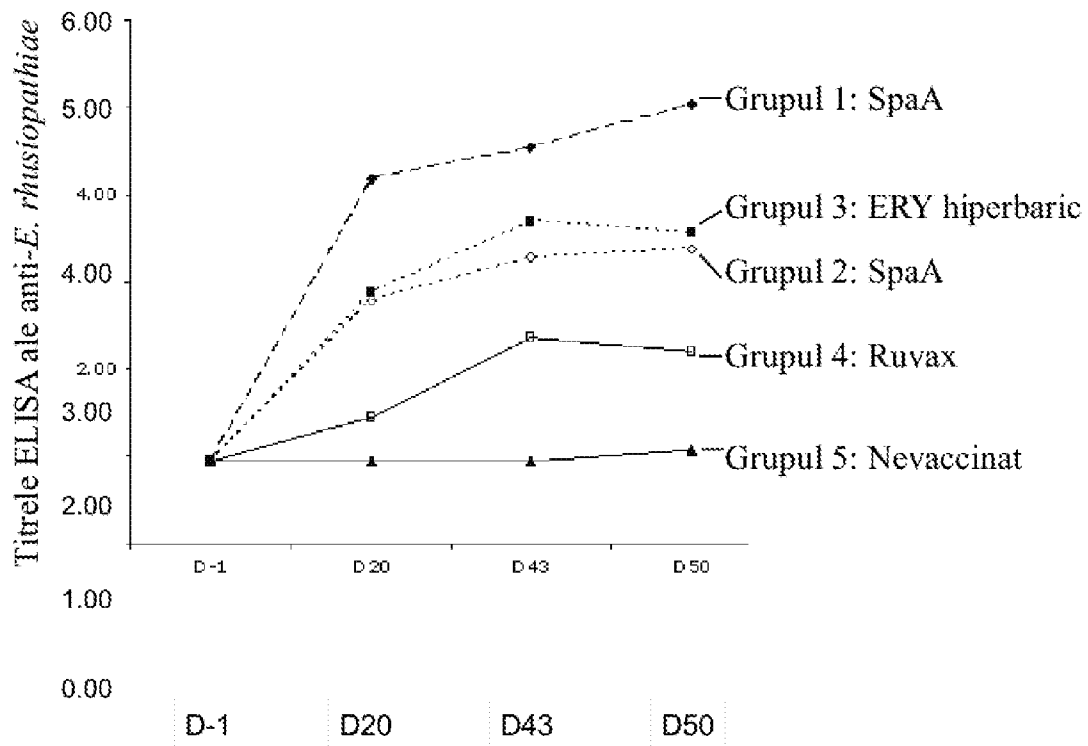


Fig. 23

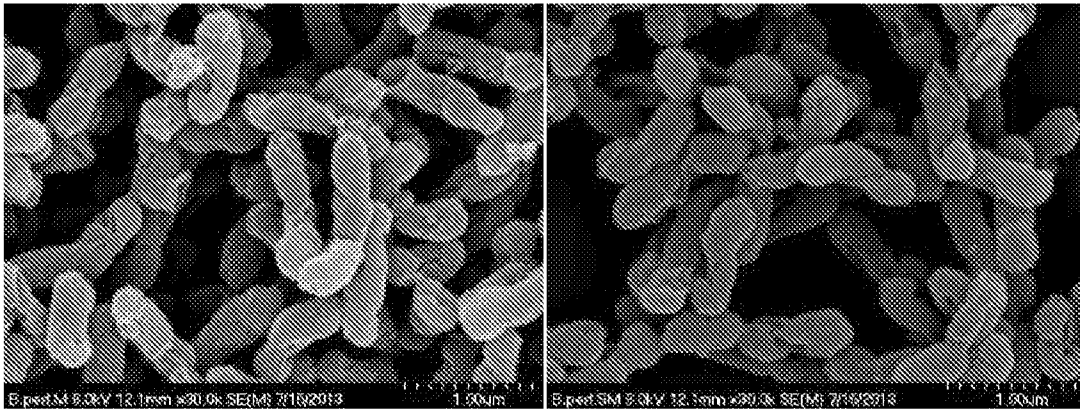


Fig. 24

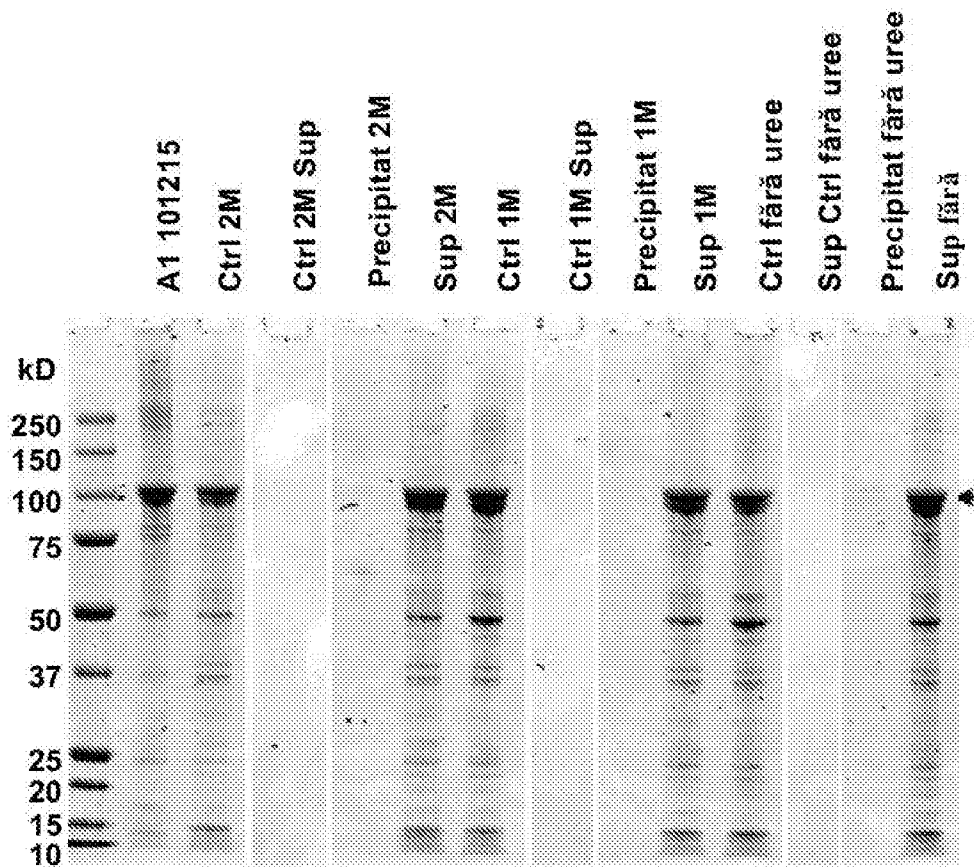


Fig. 25

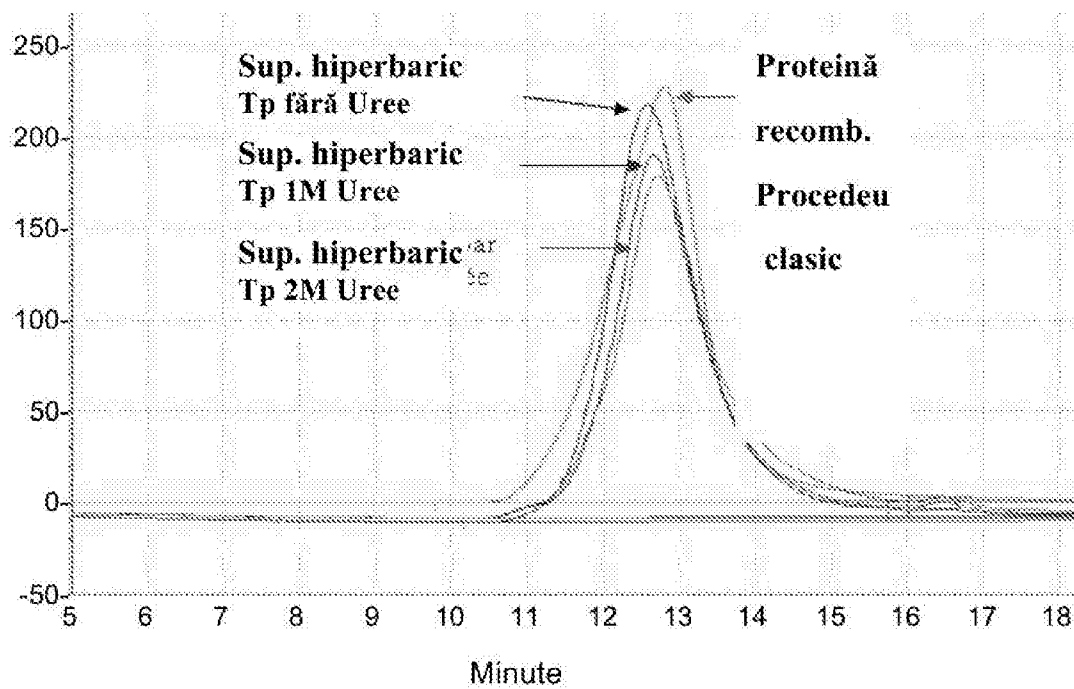


Fig. 26

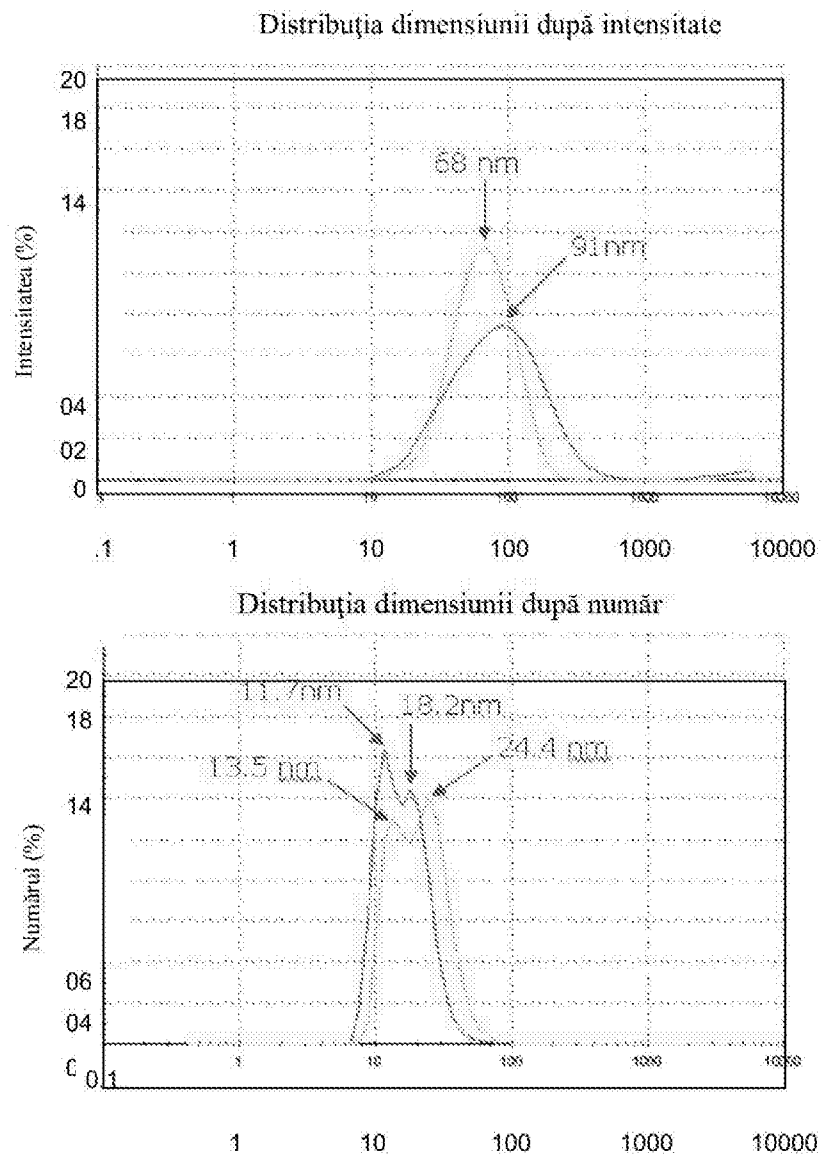


Fig. 27

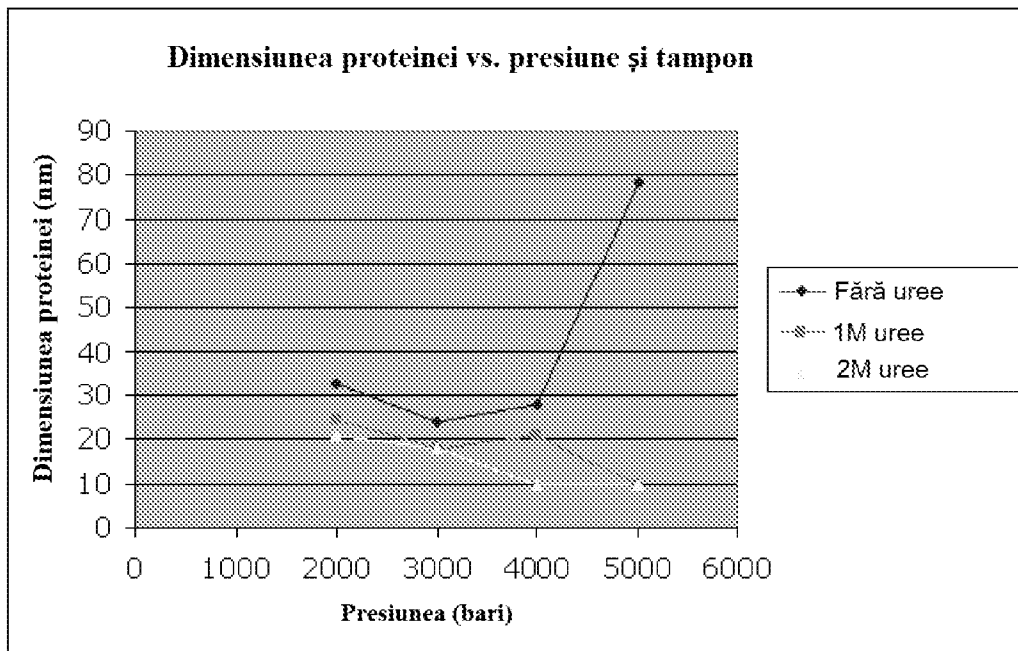


Fig. 28

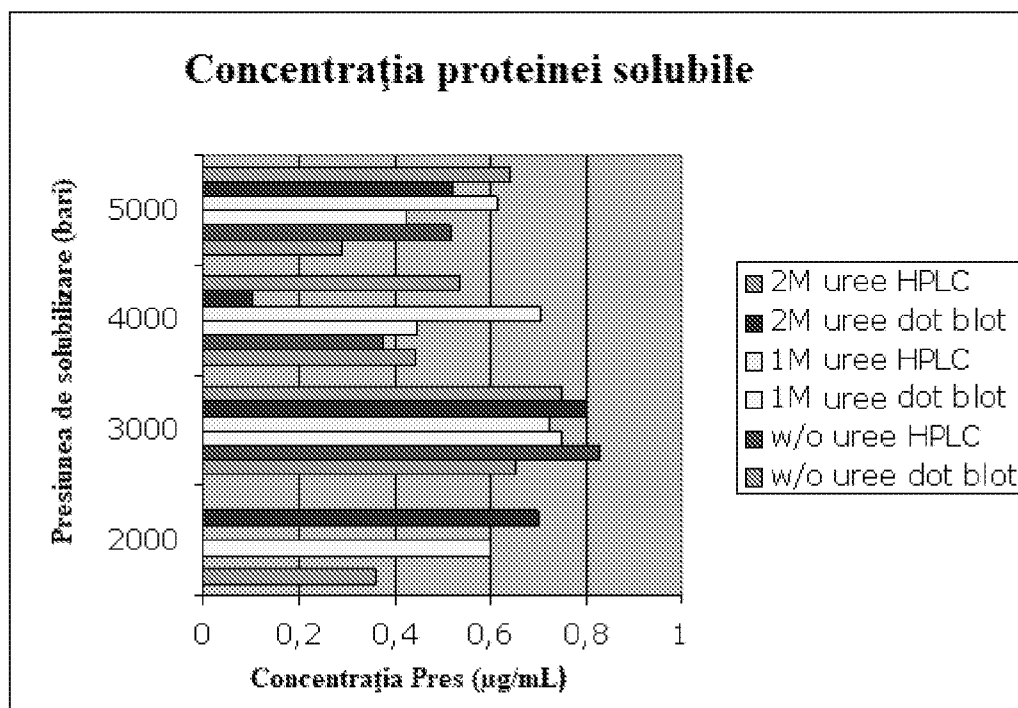
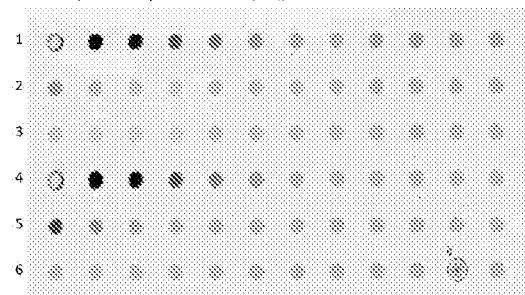


Fig. 29

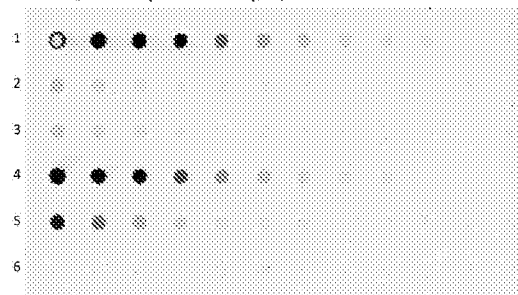
Analiza QDot Blot a proteinei KSAC prin procedeu A



- 1: referința KSAC
2: procedeu A fără DTT (proba 1)
3: control fără DTT (proba 3)
4: procedeu A fără DTT (proba 2)
5: control fără DTT (proba 4)
6: 20 mM tampon Tris

(A)

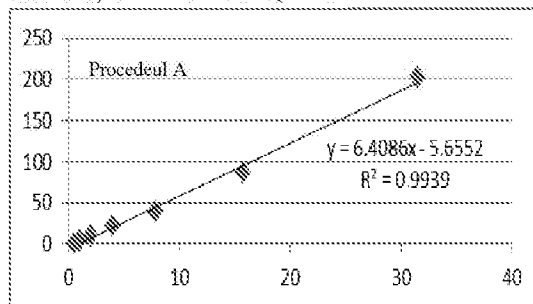
Analiza QDot Blot a proteinei KSAC prin procedeu B



- 1: referința KSAC
2: procedeu B fără DTT (proba 5)
3: control fără DTT (proba 7)
4: procedeu B fără DTT (proba 6)
5: control fără DTT (proba 8)
6: 20 mM tampon Tris

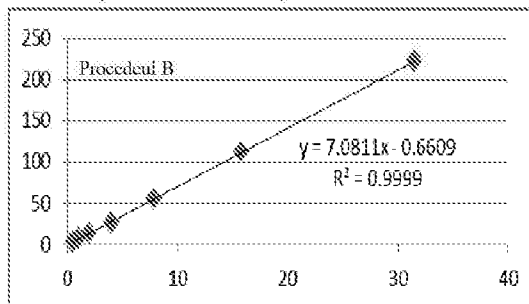
(B)

Cuantificarea proteinei KSAC din analiza QDot Blot



(C)

Cuantificarea proteinei KSAC din analiza QDot Blot



(D)

Fig. 30

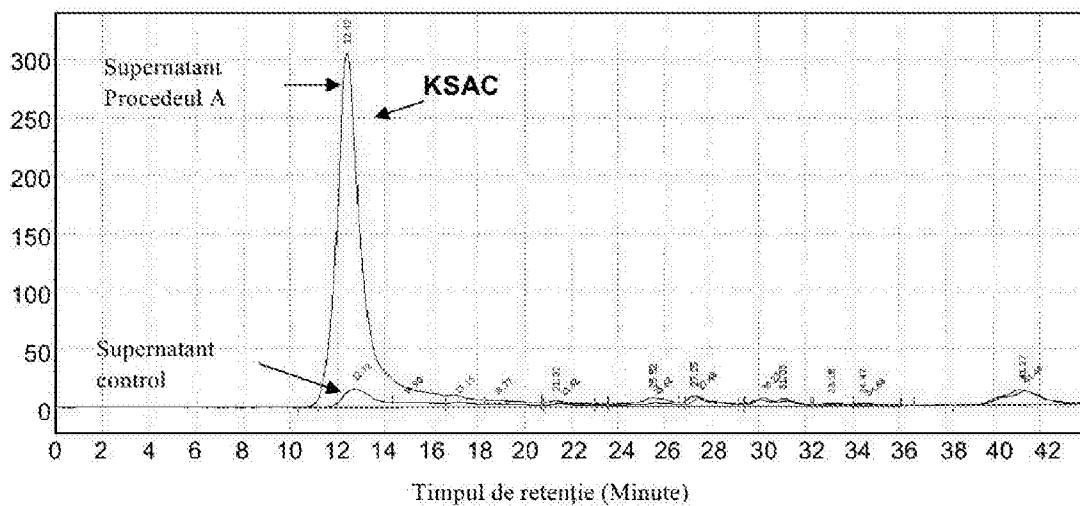
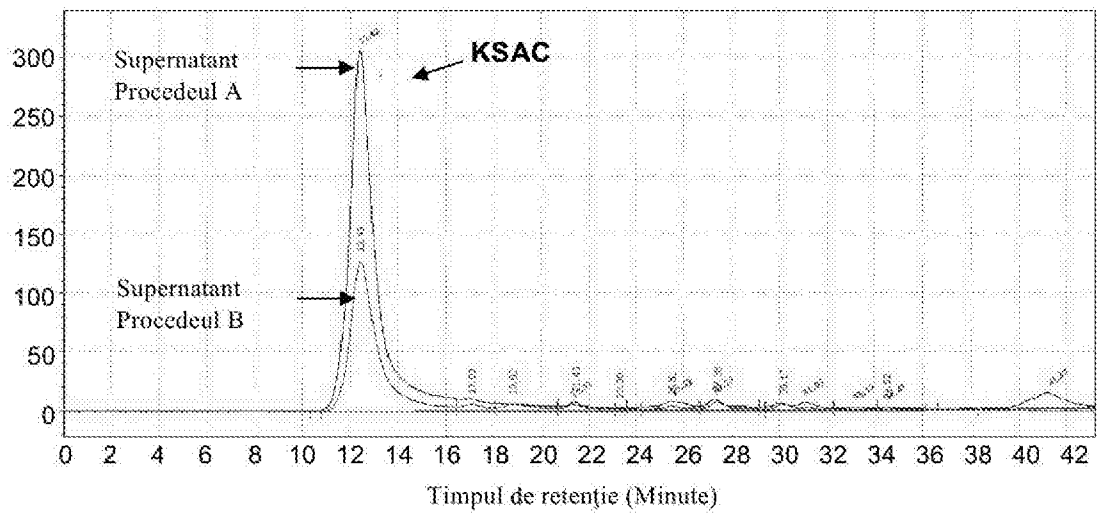


Fig. 31



RAPORT DE DOCUMENTARE

I. Datele de identificare a cererii		
(21) Nr. depozit: a 2015 0031 (32) Data de prioritate recunoscută: 2012.08.30; 2013.06.03 (22) Data depozit: 2013.08.30 Raport de documentare internațională: ☒ da (71) Solicitant: MERIAL INC., US; TOP INDUSTRIE S.A.S., FR (54) Titlul: Dispozitiv hiperbaric și metode de producere a vaccinurilor inactivate și proteinelor recombinante repliate/solubilizate		
II. Clasificarea obiectului invenției: (51) Int.Cl: A61K 39/008 (2006.01) C07K 1/113 (2006.01) C12N 15/62 (2006.01) A23L 3/015 (2006.01)		
III. Colecții și Baze de date de brevete cercetate (denumirea, termeni caracteristici, ecuații de căutare reprezentative)		
MD - Intern « Documentare Invenții » (inclusiv cereri nepublicate; trunchiere automată stanga/dreapta): A31K, C07K, C12N, A23L, merial, top industrie, hiperbaric, microorganisme, proteine, recombinant, repliat, solubilizat "Worldwide" (Espacenet): A31K, C07K, C12N, A23L, merial, top industrie, hyperbaric, inactivated, recombinant proteins, microorganism, recombinant, refolding, solubiliz SU, EA, CIS (Eapatis): A31K, C07K, C12N, A23L, merial, top industrie, гипербарич*, инактив*, микроорганизм*, иммуноген*, белк*, рекомбинант*, свернут*, солюбилизированн*		
IV. Baze de date și colecții de literatură nonbrevet cercetate www.google.ru		
V. Documente considerate a fi relevante		
Categorie*	Date de identificare ale documentelor citate si, unde este cazul, indicarea pasajelor pertinente	Numărul revendicării vizate
A, D	C. SILVA ET AL., "Effect of hydrostatic pressure on the Leptospira interrogans: high immunogenicity of the pressure-inactivated serovar hardjo", VACCINE, (2001), vol. 19, pages 1511 - 1514,	1-45
A, D	M. RITZ ET AL., "Effects of high hydrostatic pressure on membrane proteins of Salmonella typhimurium", INTERNATIONAL JOURNAL OF FOOD MICROBIOLOGY, (2000), vol. 55, pages 115 - 119,	1-45

A, D	ISBAM S. ET AL., "Inactivation of avian influenza virus by heat and high hydrostatic pressure", JOURNAL OF FOOD PROTECTION, (2007), vol. 70, pages 667 - 673	1-45
A, D, C	N. WILKINSON ET AL., "Resistance of poliovirus to inactivation by high hydrostatic pressures", INNOVATIVE FOOD SCIENCE AND EMERGING TECHNOLOGIES, (2001), vol. 2, pages 95 - 98	1-7
A, D, C	SHEARER; KNIEL, "High Hydrostatic Pressure for Development of Vaccines", JOURNAL OF FOOD PROTECTION, (2009), vol. 72, no. 7, pages 1500 - 1508	8-37
A, D, C	US 2008161242 A1 2008.07.03	38-45
A	WO 2004000451 A2 2003.12.31	1-45
A	WO 2011091860 A1 2011.08.04	1-45
A	US 2002076347 A1 2002.06.20	1-45
A	HERNANDO-SAIZ ET AL, "Advances in design for successful commercial high pressure food processing", FOOD AUSTRALIA, NORTH SYDNEY, AU, (20080401), vol. 60, no. 4	1-45
A	MARTIN M F SAN ET AL, "Food processing by high hydrostatic pressure", CRITICAL REVIEWS IN FOOD SCIENCE AND NUTRITION, TAYLOR & FRANCIS, USA, (20021101), vol. 42, no. 6	1-45
A	ZIMMERMAN F ET AL, "ISOSTATIC HIGH-PRESSURE EQUIPMENT FOR FOOD PRESERVATION", FOOD TECHNOLOGY, INSTITUTE OF FOOD TECHNOLOGISTS, CHICAGO, IL, US, (19930601), vol. 47, no. 6	1-45
A	QORONFLEH ET AL, "Confronting high-throughput protein refolding using high pressure and solution screens", PROTEIN EXPRESSION AND PURIFICATION, ACADEMIC PRESS, SAN DIEGO, CA, (20070908), vol. 55, no. 2	1-45

*** categoriile speciale ale documentelor citate:**

A – document care definește stadiul anterior general	T – document publicat după data depozitului sau a priorității invocate, care nu aparține stadiului pertinent al tehnicii, dar care este citat pentru a pune în evidență principiul sau teoria pe care se bazează invenția
X – document de relevanță deosebită: invenția revendicată nu poate fi considerată nouă sau implicând activitate inventivă când documentul este luat în considerație de unul singur	E – document anterior dar publicat la data depozit național reglementar sau după aceasta dată
Y – document de relevanță deosebită: invenția revendicată nu poate fi considerată ca implicând activitate inventivă când documentul este asociat cu unul sau mai multe documente de aceeași categorie	D – document menționat în descrierea cererii de brevet
O - document referitor la o divulgare orală, un act de folosire, la o expoziție sau la orice alte mijloace de divulgare	C – document considerat ca cea mai apropiată soluție
	& – document, care face parte din aceeași familie de brevete

P - document publicat înainte de data de depozit, dar după data priorității invocate	L – document citat cu alte scopuri
Data finalizării documentării 2018.03.26	
Examinator GHIȚU Irina jr.	